

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS**

**“PRODUCCIÓN DE PECTINASAS CON UN HONGO  
FILAMENTOSO E INMOVILIZACIÓN EN NANOESTRUCTURAS  
CORE-SHELL DE  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGOS”**

**Presentada por:**

**ARELY SUGEY NÚÑEZ SERRANO**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

**ABRIL 2021**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



Maestría en ciencias con orientación en  
Microbiología Aplicada

**“Producción de pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilización en nanoestructuras *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  para la clarificación de jugos”**

**Por:**

**Arely Sugey Núñez Serrano**

**Asesora:**

**Dra. Alcione García González**

**Co-Asesores:**

**Dr. Bernardo García Reyes**

**Dra. Sara Elena Solís Pereira**

Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

**“Producción de pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilización en nanoestructuras *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  para la clarificación de jugos”**

Aprobación de la tesis

---

DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ  
PRESIDENTE

---

DRA. ALMA ELIZABETH GÓMEZ LOREDO  
SECRETARIO

---

DR. EDGAR ALLAN BLANCO GÁMEZ  
VOCAL

---

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS  
SUB-DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Maestría en ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

**“Producción de pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilización en nanoestructuras *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  para la clarificación de jugos”**

Comité tutorial

---

DRA. ALMA E. GOMEZ LOREDO  
COMITÉ TUTORIAL

---

DR. EDGAR ALLAN BLANCO GAMEZ  
COMITÉ TUTORIAL

---

DR. ULRICO J. LOPEZ CHUKEN  
COMITÉ TUTORIAL

---

DR. REFUGIO BERNARDO GARCÍA REYES  
COASESOR

---

DRA. SARA ELENA SOLÍS PEREIRA  
COASESORA

**Arely Sugey Núñez Serrano**

**Fecha de grado: junio 2021**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título del estudio: “PRODUCCIÓN DE PECTINASAS CON UN HONGO FILAMENTOSO E INMOVILIZACIÓN EN NANOESTRUCTURAS CORE-SHELL DE  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  PARA LA CLARIFICACIÓN DE JUGOS”**

**Número de páginas:**

**Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias  
con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Área de estudio: Microbiología Aplicada**

**Propósito y Método de Estudio:** Las pectinasas son un grupo de enzimas que hidrolizan los compuestos pécticos presentes en la pared celular vegetal hasta moléculas de bajo peso como el ácido galacturónico. La aplicación de estas enzimas en la industria de los alimentos es de amplio interés debido a su alta capacidad y rendimiento en el tratamiento de clarificación, sin embargo, la dificultad de reciclaje de estas enzimas limita el uso y aumentan los costos industriales. La inmovilización de enzimas aporta diversas ventajas como la fácil recuperación de éstas, así como mayores ciclos de uso. Por lo tanto, en este trabajo se realizó una producción de enzimas pectinolíticas a partir de un hongo nativo utilizando agro residuos como cosustratos. Posteriormente las pectinasas semi purificadas fueron inmovilizadas mediante enlace covalente en nanopartículas magnéticas. Se evaluó la capacidad de reducción de viscosidad y turbidez de las pectinasas obtenidas en jugo de naranja y manzana.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se logró producir pectinasas a partir de un hongo identificado morfológicamente como *Penicillium sp.*, alcanzando la máxima actividad enzimática (548 U/mL) utilizando cáscara de limón como cosustrato a 35°C y pH 6.0. Mediante concentración proteica utilizando membrana de ultrafiltración (50 kDa), la actividad enzimática total aumento aproximadamente 10%. Se inmovilizaron las pectinasas en nanopartículas magnéticas mediante enlace covalente reteniendo un 80% de actividad inicial. Las pectinasas inmovilizadas presentaron mayor estabilidad a pH ácidos (4.5) y temperaturas altas (50° C), así como la capacidad de reducción de turbidez en jugo de naranja (29%), manteniendo una reusabilidad de 84% posterior a 5 ciclos de uso.

**FIRMA DEL ASESOR:**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero externar un agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León y la Facultad de Ciencias Químicas por la oportunidad brindada en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado.

A mi asesora Dra. Alcione García, por aconsejarme, por su paciencia, enseñanzas, por poner su confianza en mí para realizar este proyecto y por dirigirlo con tanta dedicación. Ha sido un gusto trabajar con usted y ser su alumna durante estos dos años.

Dr. Bernardo García, gracias por sus comentarios, consejos y su valiosa aportación e interés mostrado a lo largo de este trabajo.

Dra. Sara Solís, por sus grandes aportaciones y comentarios brindados para realizar este trabajo de investigación de la mejor manera posible.

A mi comité tutorial, Dra. Alma Gómez, Dr. Allan Blanco, Dr. Ulrico López, por sus sugerencias brindadas en este trabajo de tesis. A los doctores y técnicos por compartir sus áreas de trabajo, material y equipos para poder cumplir con los objetivos planteados en esta investigación.

Al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO), CINVESTAV Unidad Mérida y al Ing. Cauich Ruiz Wilian Javier, Auxiliar de Investigación por el apoyo y accesibilidad en análisis de materiales.

A mis compañeros de maestría Jordy, Carlos, Francisco, Alex, Lis y Saúl, principalmente por brindarme su amistad y apoyo en todo momento, un gusto coincidir y recorrer este camino con ustedes. A mis compañeros de laboratorio, por su amabilidad y accesibilidad en resolver cualquier duda que surgiera mientras realizaba este trabajo. Un sincero agradecimiento a cada una de las personas que de alguna u otra forma han influido en mi vida para llegar hasta aquí.

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de tesis, a mi mamá, mi papá y hermana, por todo el apoyo brindado, por creer en mí, y por impulsarme a realizar cada una de mis metas planteadas, les agradezco mucho siempre. A mi familia, principalmente a mi abuelo sr. Alberto Serrano, por siempre motivarme a crecer, por confiar en mí, por todos sus consejos y apoyarme en cada etapa profesional en mi vida.

A todos los que me han enseñado, ayudado a crecer personal y profesionalmente y ser mejor cada día.



# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 INDUSTRIA DE JUGOS .....	3
1.1.2 CLARIFICACIÓN .....	6
1.2 PECTINA .....	7
1.2.1 PROPIEDADES GELIFICANTES .....	9
1.3 PECTINASAS .....	10
1.4 HONGO <i>PENICILLIUM SP.</i> .....	13
1.4.1 PECTINASAS DE HONGO <i>PENICILLIUM SP.</i> .....	14
1.5 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	14
1.5.1 INMOVILIZACIÓN EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	15
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>17</b>
2.1 ANÁLISIS CRÍTICO DE LA LITERATURA .....	18
2.2 APORTACIÓN CIENTÍFICA .....	19
2.3 HIPÓTESIS .....	19
2.4 OBJETIVOS Y METAS .....	19
2.4.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
3.1 AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA.....	21
3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA .....	21
3.3 PROPAGACIÓN DE ESPORAS .....	21
3.4 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA .....	22
3.4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS .....	22
3.5 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA POR PESO SECO .....	23
3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS .....	23
3.6.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES .....	23
3.6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR .....	23
3.6.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	24
3.7 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	24
3.8 PURIFICACIÓN PARCIAL ENZIMÁTICA .....	25
3.8.1 ULTRAFILTRACIÓN .....	25
3.8.2 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO .....	25
3.8.3 CROMATOGRAFÍA EXCLUSIÓN POR TAMAÑO .....	26
3.8.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA .....	26
3.9 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS .....	26
3.10 SÍNTESIS DE LA NANOESTRUCTURA $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ Y MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE .....	27
3.10.1 CARACTERIZACIÓN DEL <i>CORE-SHELL</i> $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ .....	27
3.10.1.1 SEM .....	28
3.10.1.2 POTENCIAL Z .....	28

3.10.1.3 DIFRACCIÓN DE RAYOS X .....	28
3.10.1.4 ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA CON ATR-FTIR .....	29
3.10.1.5 XPS.....	29
3.11 INMOVILIZACIÓN DE PECTINASAS PARCIALMENTE PURIFICADAS.....	29
3.12 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DE ENZIMAS INMOVILIZADAS EN LA CLARIFICACIÓN DE JUGOS.....	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
4.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA .....	31
4.2 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA .....	32
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.....	37
4.4 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA Y DENSIDAD ÓPTICA.....	39
4.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA .....	41
4.5.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES .....	42
4.6 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA .....	45
4.7 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	47
4.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA .....	49
4.7.2 EFECTO DEL PH.....	50
4.8 PURIFICACIÓN PARCIAL ENZIMÁTICA .....	51
4.8.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR POR SDS-PAGE .....	53
4.9 PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ENZIMA LIBRE .....	54
4.10 SÍNTESIS DEL <i>CORE-SHELL</i> .....	56
4.11 CARACTERIZACIÓN DEL <i>CORE-SHELL</i> .....	57
4.11.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X .....	57
4.11.2 POTENCIAL z .....	58
4.11.3 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	59
4.11.4 ESPECTROSCOPÍA DE ENERGÍA DISPERSIVA .....	61
4.11.5 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO CON ATR.....	62
4.11.6 ESPECTROSCOPÍA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X.....	64
4.12 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	66
4.12.1 CONCENTRACIÓN DE GLUTARALDEHÍDO COMO ENLACE COVALENTE .....	66
4.12.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RETENIDA Y CAPACIDAD DE ADSORCIÓN SOBRE EL MATERIAL DE SOPORTE DURANTE LA INMOVILIZACIÓN .....	67
4.13 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	69
4.14 PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA .....	72
4.15 CLARIFICACIÓN DE JUGOS .....	73
4.15.1 REDUCCIÓN DE TURBIDEZ EN JUGO DE MANZANA Y NARANJA.....	73
4.15.2 REUSABILIDAD DE LA PECTINASA INMOVILIZADA EN <i>CORE-SHELL</i> .....	75
4.15.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA REDUCIR LA VISCOSIDAD DE JUGOS DE NARANJA Y MANZANA .....	76
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>91</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
<b>TABLA 1.</b> ESPECIFICACIONES DE LA CALIDAD DEL JUGO .....	4
<b>TABLA 2.</b> CONTENIDO PÉCTICOS EN CÍTRICOS .....	7
<b>TABLA 3.</b> CONDICIONES ÓPTIMAS EN LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS EN DIFERENTES MICROORGANISMOS .....	11
<b>TABLA 4.</b> VARIABLES INDEPENDIENTES EN EL DCC DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.....	22
<b>TABLA 5.</b> VARIABLES UTILIZADAS PARA DCC OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	25
<b>TABLA 6.</b> VARIABLES UTILIZADAS EN DCC OPTIMIZACIÓN DE LAS ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INMOVILIZADA .....	30
<b>TABLA 7.</b> ACTIVIDAD ENDO-PECTINOLÍTICA PRODUCIDA EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA .....	37
<b>TABLA 8.</b> RESULTADOS DEL ANOVA VARIANDO LOS COSUSTRATOS UTILIZADOS, $R^2$ 0.96 .....	38
<b>TABLA 9.</b> RESULTADOS PRUEBA DE TUKEY PRODUCCIÓN DE PECTINASAS .....	38
<b>TABLA 10.</b> DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA LAS VARIABLES UTILIZADAS COMO RESPUESTA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN ÓPTIMA .....	46
<b>TABLA 11.</b> DISEÑO CENTRAL COMPUESTO DE LAS VARIABLES UTILIZADAS EN LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA .....	48
<b>TABLA 12.</b> ETAPAS DE PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA SECUENCIAL .....	51
<b>TABLA 13.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS $V_{MAX}$ Y $K_M$ DE ENZIMAS DETERMINADOS EN SUSTRATO PÉCTICO (0.5 - 2.5 MG/ML) POR EL MODELO MICHAELIS-MENTEN.....	55
<b>TABLA 14.</b> CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL SINTETIZADO MEDIANTE POTENCIAL Z.....	58
<b>TABLA 15.</b> CONTENIDO ATÓMICO SUPERFICIAL (%) EN NANOPARTÍCULAS DETERMINADO POR XPS .....	64
<b>TABLA 16.</b> EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PECTINASAS SOBRE LA ACTIVIDAD RETENIDA DURANTE LA INMOVILIZACIÓN Y LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN SOBRE EL MATERIAL DE SOPORTE .....	68
<b>TABLA 17.</b> DISEÑO CENTRAL COMPUESTO DE LAS VARIABLES UTILIZADAS EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMOVILIZADA .....	71
<b>TABLA 18.</b> PARÁMETROS CINÉTICOS $V_{MAX}$ Y $K_M$ DE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA EN SUSTRATO PÉCTICO (0.5 - 2.5 MG/ML) POR EL MODELO MICHAELIS-MENTEN.....	72
<b>TABLA 19.</b> RESULTADOS DEL ANOVA DE MODELO CUADRÁTICO DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA .....	91
<b>TABLA 20.</b> RESULTADOS DEL ANOVA DE MODELO CUADRÁTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	91

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
FIG. 1 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL DE LA PRODUCCIÓN DE JUGO DE FRUTAS .....	5
FIG. 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PECTINA .....	8
FIG. 3 ESTRUCTURA GELIFICANTE DE LA PECTINA.....	9
FIG. 4 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS QUÍMICAMENTE .....	16
FIG. 5 A) CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HONGO FILAMENTOSO AISLADO EN PDA. B) CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS OBSERVADAS CON MICROSCOPIO ÓPTICO A 100X.....	31
FIG. 6 A) PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA A 35°C POR 168 H DE FERMENTACIÓN. B) PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA POSTERIOR A LA ADAPTACIÓN DEL HONGO .....	35
FIG. 7 DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA Y DENSIDAD ÓPTICA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA.....	40
FIG. 8 PROTEÍNA EXTRACELULAR PRODUCIDA EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA A 240 H DE UTILIZANDO COSUSTRATO DE CÁSCARA DE LIMÓN .....	41
FIG. 9 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ML), LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/MG) PRODUCIDA EN FERMENTACIÓN COMO COSUSTRATO CÁSCARA DE LIMÓN .	42
FIG. 10 A) FENOLES TOTALES PRESENTES EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA UTILIZANDO DIFERENTES COSUSTRATOS. B) COMPARACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN MEDIO CON CÁSCARA DE LIMÓN CON Y SIN INÓCULO .	44
FIG. 11 A) SUPERFICIE DE RESPUESTA Y B) GRÁFICO DE CONTORNO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y PH CON RESPECTO A LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA.....	46
FIG. 12 A) GRÁFICA DE CONTORNO Y B) SUPERFICIE DE RESPUESTA MUESTRA EL PUNTO ÓPTIMO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CON RESPECTO AL PH Y TEMPERATURA .....	48
FIG. 13 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.....	49
FIG. 14 EFECTO DEL PH EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL EXTRACTO ENZIMÁTICA .....	50
FIG. 15 DIAGRAMA DEL COMPORTAMIENTO DE LAS FRACCIONES EN SEPHADEX G-100 CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN PROTEICA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA .....	52
FIG. 16 SDS-PAGE DE PECTINASA. (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR, (2) PECTINASA DE <i>A.NIGER</i> Y (3) PECTINASA A PARTIR DE ULTRAFILTRACIÓN (<50 KDA) .....	53
FIG. 17 GRÁFICA DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS MICHAELIS-MENTEN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO ULTRAFILTRADO .....	55
FIG. 18 A) DISPERSIÓN DE NANOPARTÍCULAS B) <i>CORE-SHELL</i> RECUPERADO MEDIANTE CAMPO MAGNÉTICO .....	56
FIG. 19 DIFRACTOGRAMA DEL MATERIAL SINTETIZADO Y FUNCIONALIZADO.....	57
FIG. 20 IMÁGENES SEM A) $Fe_3O_4$ , B) $Fe_3O_4-SiO_2$ , C) $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ .....	60
FIG. 21 ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA (EDS) A) $Fe_3O_4$ , B) $Fe_3O_4-SiO_2$ , C) $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ .....	62
FIG. 22 ESPECTROS FT-IR DE LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS, NO RECUBIERTAS Y AMINADAS .....	63
FIG. 23. XPS DE LAS NANOPARTÍCULAS A) $Fe_3O_4-SiO_2$ Y B) $Fe_3O_4-SiO_2-NH_2$ -GLUTARALDEHÍDO .....	65
FIG. 24 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RETENIDA EN LA INMOVILIZACIÓN DE PECTINASAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUTARALDEHÍDO .....	67

<b>FIG. 25</b> PECTINASA INMOVILIZADA EN SOPORTE EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA FINAL.....	69
<b>FIG. 26</b> A) GRÁFICA DE CONTORNO Y B) SUPERFICIE DE RESPUESTA MUESTRA EL PUNTO ÓPTIMO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INMOVILIZADA CON RESPECTO AL PH Y TEMPERATURA.....	71
<b>FIG. 27</b> REDUCCIÓN DE TURBIDEZ (%) MEDIANTE ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA EN JUGO DE A) MANZANA Y B) NARANJA.....	74
<b>FIG. 28</b> REUSABILIDAD DE PECTINASA INMOVILIZADA EN $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ EN JUGO DE NARANJA.....	76
<b>FIG. 29</b> VISCOSIDAD DETERMINADA UTILIZANDO ENZIMA LIBRE E INMOVILIZADA EN JUGO DE A) NARANJA Y B) MANZANA.....	78

## NOMENCLATURA

% Porcentaje

< Menor a

> Mayor a

$\mu$  Viscosidad dinámica

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Microgramo por microlitro

$\mu\text{L}$  Microlitro

$\mu\text{L}$  Microlitros

$\mu\text{m}$  Micrómetro

$\mu\text{Mol}$  Micro mol

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**APTES** (3-aminopropil) trietoxisilano

**cm** Centímetros

**cP** Centipoise

**DEAE** Dietilaminoetilcelulosa

**DNS** 3,5-dinitrosalicilato

**DRX** Difracción de rayos X

**EDS** Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X

**Ev** Electronvoltio

**FTIR-ATR** Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada

**g** Gramos

**h** Horas

**ITS** Espaciador transcrito interno

**kDa** KiloDalton

**kV** Kilovoltio

**L** Litros

**M** Molar  
**mg** Miligramos  
**mg/mL** miligramos por mililitro  
**min** Minutos  
**mL** Mililitros  
**nm** Nanómetros  
**° C** grados Celsius  
**pH** Potencial de hidrógeno  
**ppm** Partes por millón  
**rpm** Revoluciones por minuto  
**s** Segundos  
**SDS-PAGE** Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida  
**SEM** Microscopía electrónica de barrido  
**TEOS** Tetraetilortosilicato  
**U/g** Unidades de actividad enzimática por gramo  
**U/mg** Unidades de actividad enzimática por miligramo  
**U/mL** Unidades de actividad enzimática por mililitro  
**UV-VIS** Ultravioleta visible  
**W** Watts  
**ζ** zeta  
**λ** longitud de onda

## 1. INTRODUCCIÓN

Las pectinas son macromoléculas glucosídicas que cumplen una función estructural en las células vegetales, se encuentran presentes en alta concentración en cascarras de cítricos, reportando valores entre 30 a 35% en peso seco en limón y naranja respectivamente, según la variedad del fruto y tipo de cultivo. La estructura de la pectina se compone de compuestos metílicos, esteres y principalmente ácido galacturónico el cual forma cadenas largas y complejas, atrapando solutos disueltos y agua en estructuras gelificantes [1].

Las pectinasas son enzimas que hidrolizan las cadenas principales y laterales de la pectina, rompiendo los enlaces glucosídicos hasta grado monomérico y por lo tanto bajando la solubilidad de la macromolécula. Clasificando a las enzimas pectinolíticas por el modo de acción se encuentran principalmente las poligalacturonasas, las cuales rompen los enlaces  $\alpha$ -1, 4-glicosídicos que unen los fragmentos del ácido galacturónico presentes en la pectina [2].

La producción industrial de pectinasas es obtenida por microorganismos, se ha reportado a los hongos filamentosos como los mayores productores de estas enzimas, especialmente aquellos pertenecientes al género *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que excretan el 90% de las enzimas hidrolíticas que producen al medio de cultivo, aproximadamente el 50% de las enzimas comerciales son obtenidas a partir de estos microorganismos mediante fermentaciones sólidas o sumergidas [3].

La expresión de genes que se encargan de producir enzimas pectinolíticas en hongos filamentosos es regulada por la inducción y represión catabólica. Se ha demostrado que el uso de pectina y compuestos poli galacturónicos en el medio de cultivo aumenta la producción de enzimas pectinasas, fungiendo como factores de inducción e incrementando la afinidad de la enzima hacia el sustrato [4].

Se ha reportado el uso de residuos agroindustriales ricos en carbohidratos y proteínas como cosustratos para la obtención de pectinasas mediante fermentación, entre los más comunes se encuentra el bagazo de caña de azúcar, café y cáscaras de cítricos, aumentando los rendimientos de producción y reduciendo los costos a



nivel industrial, esta aplicación es una fuente alternativa para disminuir el grado de contaminación generada por los desechos agrícolas y de alimentos a nivel mundial [5].

En México el mercado de jugos y bebidas de frutas aporta un valor superior a los 30 mil millones de pesos anuales según lo reportado por PROFECO (Procuraduría Federal del Consumidor) en 2018. Uno de los problemas al que se enfrenta la industria de alimentos y que genera altas pérdidas económicas es el proceso de clarificación de jugos, el cual es un método que se utiliza para disminuir el grado de turbidez y viscosidad, aumentando la calidad organoléptica del producto mejorando el aspecto sensorial como el color, la luminosidad y la consistencia que deben cumplirse de acuerdo con lo planteado en las normativas y la aceptación del consumidor. El alto grado de viscosidad y turbidez es generado durante la manipulación de la materia prima, en donde la pectina contenida en la fruta forma una masa coloidal de alta solubilidad formando un precipitado indeseable en el producto. Tradicionalmente, se utilizan métodos mecánicos como el prensado y filtrado, pero se ha demostrado que con el uso de enzimas se obtiene un rendimiento del 90% en comparación de los métodos mecánicos. El CODEX alimentario y la FDA (*Food and Drug Administration*) permite el uso de pectinasas, proveniente de microorganismo considerados como GRAS, como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* durante el tratamiento de clarificación de jugos [1].

La adición de enzimas solubles genera un problema de altos costos en la industria de alimentos debido a su limitado uso y a su difícil recuperación. Por lo que se han desarrollado tecnologías como la inmovilización enzimática, presentando mayores ventajas, ya que aporta mayor estabilidad en la actividad enzimática tanto a temperaturas más altas como a valores bajos de pH. Además, permite una fácil recuperación y un reúso en el tratamiento de clarificación, permitiendo bajar significativamente los costos de producción en las industrias [6]. Las pectinasas han sido inmovilizadas mediante métodos físicos y químicos en diferentes materiales, como el atrapamiento de enzimas en PVA [7] y perlas de alginatos [8]. Se ha evaluado el uso de nanopartículas magnéticas con soportes de quitosano para la

inmovilización de enzimas pectinolíticas en donde se registra un alto rendimiento de la actividad enzimática durante mayor tiempo en el tratamiento de clarificación. Se ha reportado que las pectinasas inmovilizadas ganan estabilidad y permiten el reúso [9][10].

Por lo tanto, el propósito de este proyecto fue producir pectinasas a partir de un hongo filamentoso utilizando cáscaras de naranja y limón como inductores, mediante fermentación sumergida y realizar una inmovilización enzimática mediante enlace covalente con nanoestructuras tipo *core-shell* de  $F_3O_4@SiO_2$ , para la clarificación de jugo de manzana y naranja.

## 1.1 INDUSTRIA DE JUGOS

A nivel mundial la demanda de los jugos y néctares de frutas ha ido incrementando gradualmente debido a la aportación de nutrientes como vitaminas, minerales y antioxidantes, resultado de un estilo de vida más saludable demandado por el consumidor. Según lo mencionado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) en el 2002, el mercado de jugos de frutas orgánicas alcanzó un valor de 90 millones de dólares y en Europa se reportó una venta de 12 millones de litros vendidos, estimando un alcance de 100 millones de litros a largo plazo. En México el mercado de jugos y bebidas de frutas aporta un valor superior a los 30 mil millones de pesos anuales.

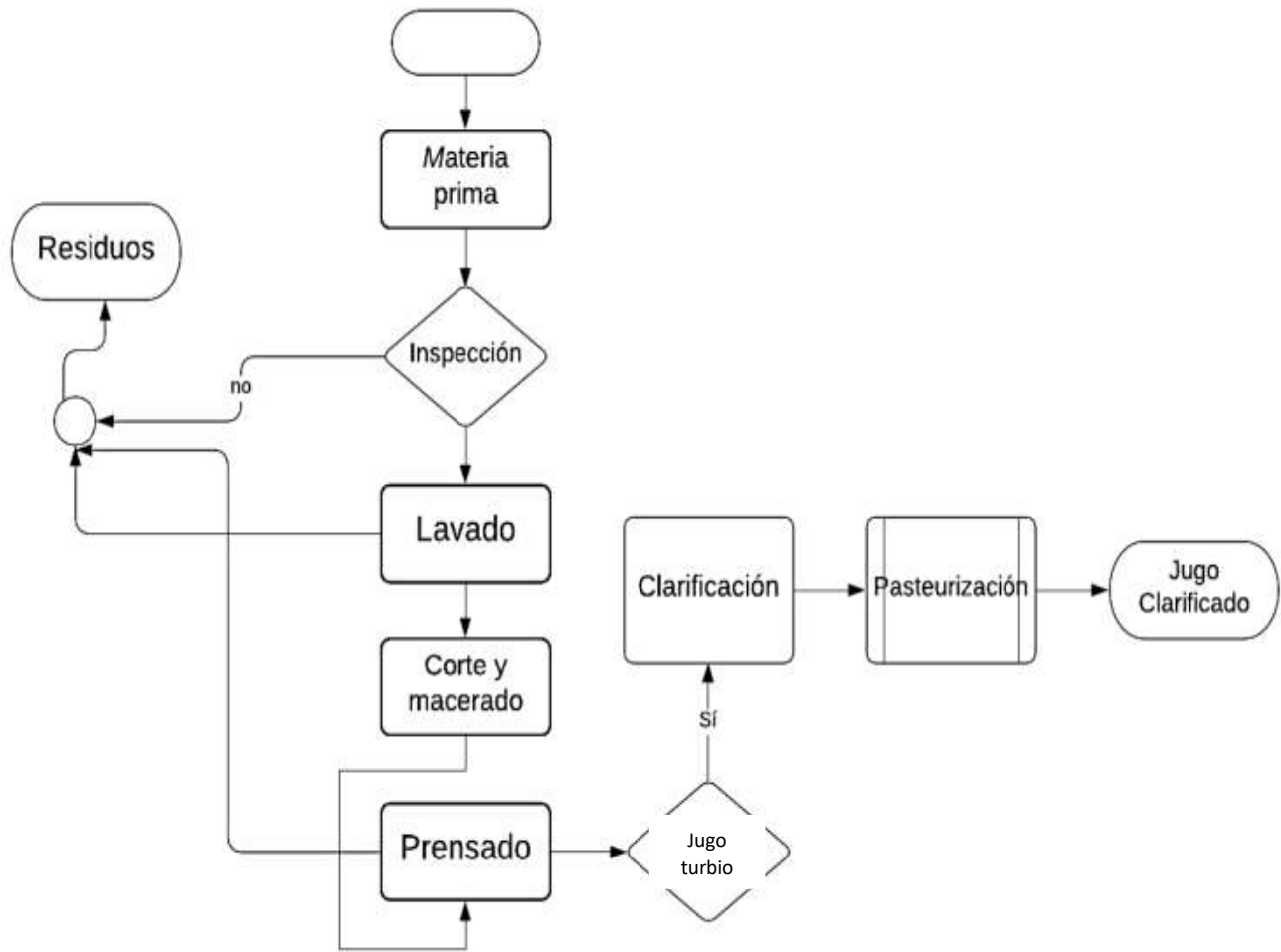
La producción y comercio de jugos y bebidas están reguladas por la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009 (TABLA 1), en donde se define al jugo como el producto líquido sin fermentar obtenido al exprimir frutas en buen estado, maduras y frescas el cual debe prepararse mediante procedimientos que mantenga las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales de la fruta, no debe encontrarse semillas o materia extraña y debe ser envasado asegurando la conservación inocua.

**TABLA 1.** Especificaciones de la calidad del jugo

<b>CARACTERÍSTICAS SENSORIALES</b>	
Color	Característico semejante a la variedad empleada
Olor	Característico del jugo que se trate
Sabor	Característico del jugo de que se trate, sin sabores extraños
<b>CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS</b>	
Sólidos disueltos mínimos de la fruta correspondiente (° Brix)	10 -11.8
Relación Isotópica de Carbono (13 C/12 C)	<-24 -28

Mantener la calidad sensorial y nutricional de la fruta a través del procesamiento resulta complicado debido a la alta sensibilidad de la materia prima a diferentes tratamientos; el tamaño, el clima y la variedad de la fruta son factores que interfieren en el porcentaje de rendimiento industrial (40 - 60%) y la calidad del jugo, una fruta deteriorada tanto por el clima como por factores microbiológicos disminuirán cualidades sensoriales y nutricionales [11].

La elaboración de jugo consiste en una serie de pasos sin gran variación según la fruta a procesar. La producción (FIG.1) inicia con la recepción y almacenamiento de la materia prima, en donde se inspecciona y se lava tratando de eliminar polvo o microorganismos procedentes del lugar de cosecha, es indispensable que se elimine la cáscara de la fruta y evitar la oxidación de la pulpa, se continua con el corte y exprimido en donde se destaca el prensado hidráulico, en este paso se separa el producto deseado de partículas y materia extraña como semillas y aceites esenciales residuales de las cáscaras de la fruta tratada, es necesario separar la pulpa del jugo con el fin de garantizar la calidad del producto. Posteriormente, se realiza un tratamiento de clarificación que consiste tradicionalmente de una maquina tamizadora de tornillo helicoidal, centrifugación y filtración. Para asegurar la esterilización se realiza un tratamiento de altas temperatura en corto tiempo, la calidad e inocuidad del producto son monitoreados en cada etapa del proceso [12].



**FIG. 1** Diagrama de flujo general de la producción de jugo de frutas

### 1.1.2 CLARIFICACIÓN

El proceso de clarificación es llevado a cabo mediante métodos mecánicos como la filtración y el prensado con la finalidad de obtener un producto que cumpla los requerimientos establecidos de acuerdo a las normativas de calidad, generalmente es utilizado en la industria de bebidas como el vino y jugos de frutas con el objetivo de eliminar la turbidez indeseada causada por la presencia de polisacáridos como pectina y celulosa y cumplir las características demandadas por el consumidor con un producto homogéneo, claro y luminoso [13].

El rendimiento de producción y la disminución de costos son factores importantes en la industria por lo que se busca alternativas que mejoren este proceso; se han utilizado tecnologías como la ultrafiltración para separar el *serum* de la pulpa de fruta, en donde el tratamiento de clarificación consiste en un depósito de acero inoxidable a bajas temperaturas continuando con una filtración a presión utilizando membrana tubular obteniendo un porcentaje de clarificación entre 50-60% de acuerdo a las condiciones empleadas en el estudio [14]. Sin embargo, limitar el tratamiento a métodos mecánicos dificulta la operabilidad adecuada de los equipos, el uso de membranas en la filtración puede llegar a taparse debido a la estructura altamente gelificante o cristalina de la pulpa del fruto, por lo cual se recurre a tratamientos enzimáticos como paso previo a la filtración con el fin de reducir mayores porcentajes de turbidez y evitar el daño a equipos utilizados durante el proceso industrial, reflejado en un incremento de ganancias económicas en la industria de alimentos [15][16].

## 1.2 PECTINA

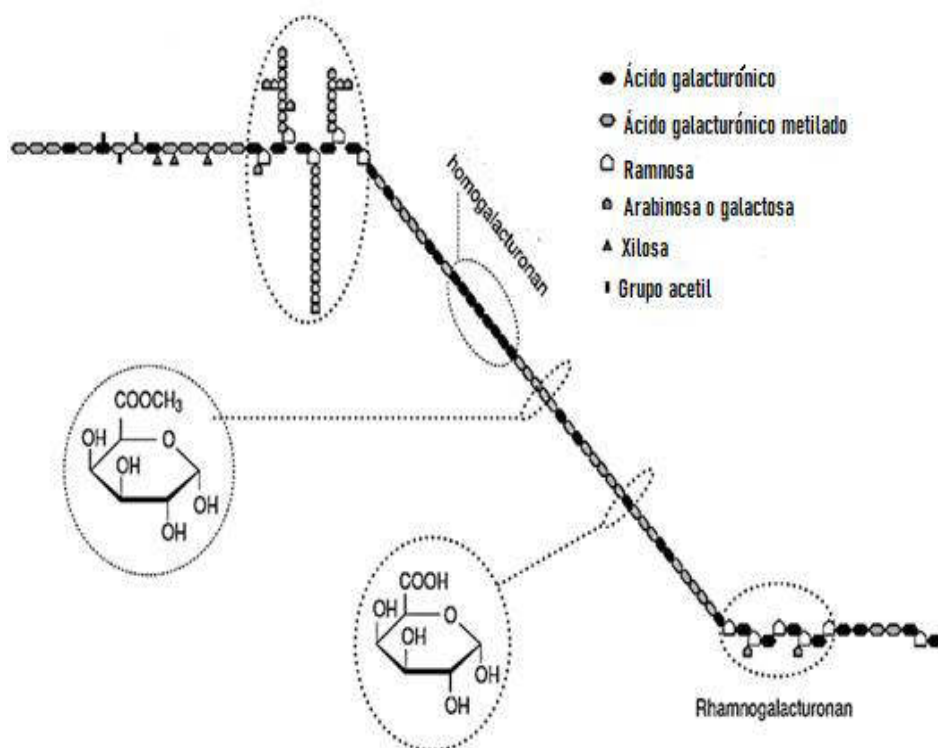
La pectina es una macromolécula compleja de alto peso molecular (100 - 200 kDa) que se encuentra presente en altas concentraciones como polisacáridos estructurales en células vegetales contribuyendo en la forma, desarrollo y crecimiento de los frutos y plantas (TABLA 2). Las propiedades físicas y químicas de la pectina varían de acuerdo con el número de polímeros que conforman la cadena, la configuración química, azúcares neutras y el tipo de planta en la que se genera; estos factores contribuyen en propiedades de la molécula como la capacidad gelificante.

**TABLA 2.** Contenido pécticos en cítricos

<b>FRUTAS</b>	<b>CONTENIDO DE PECTINA (%)</b>
Cáscara de cítricos	30
Limón	3 - 7
Naranja	0.5 – 3.5

La cadena principal de la pectina (FIG. 2) [15] es estructurada por homogalacturonato compuesto por fragmentos de ácido (1,4)-D-galacturónico en cadena lineal y con grupos ésteres metílicos en forma de ramificaciones, los cuales incrementan el peso molecular de la pectina hasta 100 unidades, cadenas laterales formadas por ramnosa con grupos acetilados (ramnogalacturonato I) y una segunda cadena de ramnogalacturonato II junto con glucosa y galactosa. El grado de ramificación de la macromolécula depende de la variedad y maduración del fruto proveniente, la esterificación de las cadenas afecta la densidad de la molécula, en los cítricos los grupos ésteres-metílicos no son ampliamente distribuidos dificultando la degradación de la pectina y en cítricos. El grado de esterificación (GE) es una forma de clasificar a la pectina; si el GE es > 50% recibe el nombre de pectina de alta-esterificación y si GE < 50% pectina baja-esterificación [11], [17]. La estabilidad de la pectina depende de los grupos esterificados, las macromoléculas con alta-esterificación son estables a pH ácidos (2 - 4) sin embargo, pueden ocurrir reacciones de despolimerización a pH arriba de 4.5; en contraste, la estructura molecular de la pectina de baja-esterificación es estable a pH básicos y altas

temperaturas, afectando la solubilidad debido a que la pectina es soluble en agua, pero insoluble en solventes orgánicos en donde la molécula se precipita. El nivel de calcio y pH así como el tipo y concentración de pectina son factores que determinan la reología de la pectina, aumentando la viscosidad y gelificación [18].

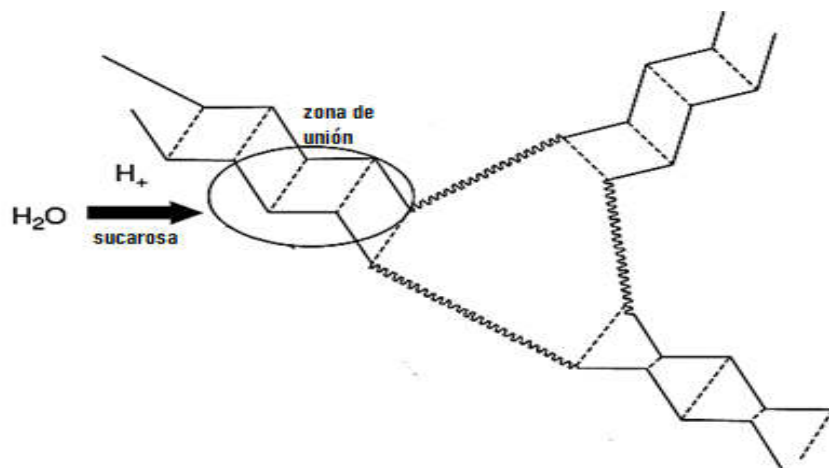


**Fig. 2** Estructura química de la pectina

### 1.2.1 PROPIEDADES GELIFICANTES

La pectina es un producto de interés comercial dirigido a la industria de alimentos y farmacéutica por su capacidad emulsificante, gelificación, viscosidad y como texturizante, es producida a partir de la extracción de cáscaras de cítricos por métodos de hidrólisis, purificación y secado.

Determinar la capacidad gelificante y la caracterización física de la pectina (FIG. 3) [15] es de gran importancia en la producción de jugos debido a que se consideran como factores que pueden afectar en la calidad del producto final ya que se ha reportado que los enlaces de los polímeros y las interacciones de estos afectan estabilidad del producto. La estructura gelificante es considerada como indeseable en la producción de bebidas, debido a que disminuye las características organolépticas deseadas por el consumidor. La gelificación varía de acuerdo con la concentración de la pectina, el peso molecular, grado de esterificación y pH; una concentración alta de pectina genera un incremento de gelificación, el alto grado de esterificación de esta macromolécula da como resultado una estructura gelificante más estable y rígida a altas temperaturas y pH, la baja solubilidad de la pectina en agua provoca la formación de aglomerados debido a la retención de agua en la estructura ramificada, así mismo, un exceso de azúcar o solutos presentes puede producir cristalización durante el almacenamiento del producto [11].



**FIG. 3** Estructura gelificante de la pectina



### 1.3 PECTINASAS

Las pectinasas son un grupo de enzimas que llevan a cabo la degradación de la cadena péctica mediante reacciones de despolimerización, deesterificación y desmetilación según la estructura química, de acuerdo con el modo de acción son clasificadas de la siguiente manera:

- Poligalacturonasas (PG): Enzimas que hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos que unen las fracciones de ácido galacturónico produciendo galacturonatos. La especificidad del sustrato las subclasifica en endo-PG (E.C. 3.2.1.15) las cuales catalizan de manera aleatoria el sustrato liberando ácidos oligolacturónicos y en exo-PG (E.C. 3.2.1.67) que hidroliza ácidos pécticos generando monogalacturonatos.
- Pectin-metil esterasas (PME): (EC 3.1.1.11) Catalizan específicamente los enlaces estermetílicos por medio de reacciones de deesterificación, produciendo metanol y pectato.
- Pectin-liasas: (EC 4.2.2.10) Catalizan los enlaces de las sustancias pécticas altamente esterificadas, produciendo galacturonatos metilados insaturados. La actividad es óptima en medio ácido y neutro.

Las enzimas pectinolíticas son producidas naturalmente por plantas que contribuyen en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema degradando material vegetal muerto y por microorganismos como bacterias, hongos y nemátodos como método de degradación de compuestos complejos para su nutrición y como mecanismo de defensa contra virus y bacterias en algunos hongos.

Son aplicadas en medios ácidos y alcalinos en diversas industrias tales como extracción de aceite, blanqueo de papel, fibras de algodón, fermentación de té y café, aditivos de alimentos y tratamiento de agua residuales. Se menciona que las pectinasas representan el 25% de las ventas mundiales de enzimas alimentarias, principalmente en la industria de bebidas en donde la exo-poligalacturonasa (Exo-PG) es aplicada para hidrolizar las moléculas de pectina causando una disminución de la turbidez del jugo [19].

Las variaciones bioquímicas y fisicoquímicas que se presentan en estas enzimas son debidas principalmente al tipo de sustrato utilizado durante la producción, así mismo, se han realizado amplios estudios sobre la generación de las poligalacturonasas, en donde se ha reportado diferencias según el microorganismo productor, la especificidad del sustrato y las condiciones óptimas de obtención [2].

Se ha estudiado la expresión genética de las pectinasas, siendo *A. niger* la especie con más trabajo de investigación en el cual se ha identificado el sistema de expresión genética pectinolítica, en donde se observa una respuesta enzimática positiva en presencia de ácido D-galacturónico, demostrando que la generación de genes que codifican las pectinasas es regulada por la fuente de carbono, es decir, la producción enzimática incrementa en presencia de moléculas derivadas de la pectina en el medio de cultivo [20].

**TABLA 3.** Condiciones óptimas en la producción de pectinasas en diferentes microorganismos

MICROORGANISMO	pH ÓPTIMO	TEMPERATURA ÓPTIMA
<i>Aspergillus niger</i>	4.6	35
<i>Bacillus subtilis</i>	10.0	65
<i>Penicillium italicum</i>	6.0-7.0	50

La producción industrial de enzimas pectinolíticas a partir de microorganismos se lleva a cabo mediante fermentación regulando parámetros como el tipo y la cantidad de sustrato, así como temperatura y condiciones óptimas del microorganismo productor (TABLA 3). La fermentación sólida es utilizada principalmente por hongos y bacterias obteniendo resultados positivos, sin embargo, la fermentación sumergida es el sistema mayormente requerido en producción a gran escala a partir de hongos esporulados, este tipo de fermentación provee de una alta productividad, así como de un fácil desarrollo y control durante el proceso, igualmente, se observan ventajas como la estabilidad genética, mayor resistencia y una fácil recuperación del producto de interés presente en el medio [2].

Las pectinasas son producidas por hongos filamentosos ha sido de mayor interés a nivel industrial debido a su alta excreción de enzimas al medio de cultivo y la fácil

recuperación de estas durante la etapa de fermentación, aumentando los rendimientos de producción. Los principales productores son los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* caracterizados por el alto potencial de excreción (90%) de enzimas pectinolíticas al medio de cultivo. De acuerdo con la regulación establecida por la FDA (*Food and Drug Administration*) estos microorganismos son reconocidos generalmente como seguros (*GRAS*), lo cual aprueba la aplicación de enzimas generadas a partir de estos en la industria de alimentos y bebidas, incrementando los rendimientos de producción [21].

Los hongos cumplen una función ecológica en los ecosistemas descomponiendo materia orgánica considerándolos como recicladores en la naturaleza. Su fuente de energía es obtenida de los carbohidratos simples, los cuales son obtenidos mediante degradación enzimática, sistema que consiste en liberar exo-enzimas y realizar una digestión extracelular, para posteriormente ingresar fracciones monoméricas a las células a través de las paredes fúngicas. Debido a que requieren compuestos orgánicos para su desarrollo, se clasifican como heterótrofos y quimiorganotrofos. El metabolismo se divide en primario y secundario, el metabolismo primario consiste en la síntesis de biomoléculas esenciales para el crecimiento del hongo, como aminoácidos y nucleótidos; el metabolismo secundario corresponde a la biosíntesis de moléculas no esenciales en donde se encuentran las enzimas codificadas por genes específicos, los hongos son de interés en el mercado debido a que los productos obtenidos de las vías del metabolismo secundario varía desde los farmacéuticos hasta venenos, como antibióticos y toxinas [22].

En la producción industrial de pectinasas mediante bioprocesos microbianos se utilizan materiales ricos en pectina, principalmente residuos agroindustriales como bagazo de caña, café, cáscaras de cítricos, almidón, actuando como efecto inductor del complejo enzimático, disminuyendo los costos de producción [19].

El proceso de purificación de enzimas producidas en fermentación sumergida comienza con un proceso de filtración con el objetivo de eliminar la biomasa y contaminantes insolubles, a continuación, se aplican diferentes métodos de

concentración entre los cuales se encuentran técnicas como la adición de sales, diálisis y ultrafiltración, siendo de gran importancia optimizar condiciones para evitar pérdidas en la actividad enzimática. La purificación de enzimas se puede realizar mediante técnicas de cromatografía generalmente intercambio iónico y filtración en gel, en donde el factor determinante es el rendimiento final de la enzima y el porcentaje en el incremento de la actividad total y específica. Es importante reducir la aplicación de métodos que generen costos extras en la producción enzimática industrial [19].

#### **1.4 HONGO *PENICILLIUM* SP.**

Uno de los géneros de hongos filamentosos más estudiados y utilizados en la industria es *Penicillium*, debido a la potencial producción de diversos metabolitos secundarios y enzimas extracelulares como las pectinasas. Las especies del hongo *Penicillium* crecen fácilmente en ambientes exteriores, con una alta capacidad de adaptación, se encuentran abundantemente en cáscaras de frutas y plantas ya que son fuentes de nutrientes en donde obtienen diversos compuestos orgánicos como glucoproteínas, según estudios anteriores la temperatura óptima para el crecimiento de este hongo es de un rango entre 30 y 35°C y pH ligeramente ácidos (4.0 - 6.0). La clasificación taxonómica está basada de acuerdo con la estructura del conidióforo, el cual puede estar pigmentado de color verde azulado rodeado de un halo blanco o amarillo dependiendo de la especie, las colonias son circulares y con aspecto esponjoso con presencia de esporas [23].

#### **1.4.1 PECTINASAS DE HONGO *PENICILLIUM SP.***

Las especies del género *Penicillium* han sido ampliamente estudiadas debido a la fácil producción de enzimas pectinolíticas, son poco demandantes para un oportuno crecimiento lo cual incrementa las ventajas para la producción a gran escala. Se ha observado un alto rango de variación de la actividad enzimática entre las especies productoras, *Penicillium oxalicum* PJ02 [24] genera entre 36.88 U/mL mediante fermentación sumergida y *Penicillium oxalicum* F67 [25] aproximadamente 8,000 U/mL, a partir de esto se ha demostrado que las características bioquímicas de estas enzimas varían según el microorganismo productor, sustratos y factores fisicoquímicos como la temperatura y pH. Según la literatura las pectinasas obtenidas a partir de *Penicillium* registran una estabilidad térmica en un rango de 30 a 50°C y pH entre 5.0 - 8.0, el peso molecular varía entre 25 a 50 kDa de acuerdo a la fracción enzimática y la especie del hongo analizado [26] [22].

#### **1.5 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA**

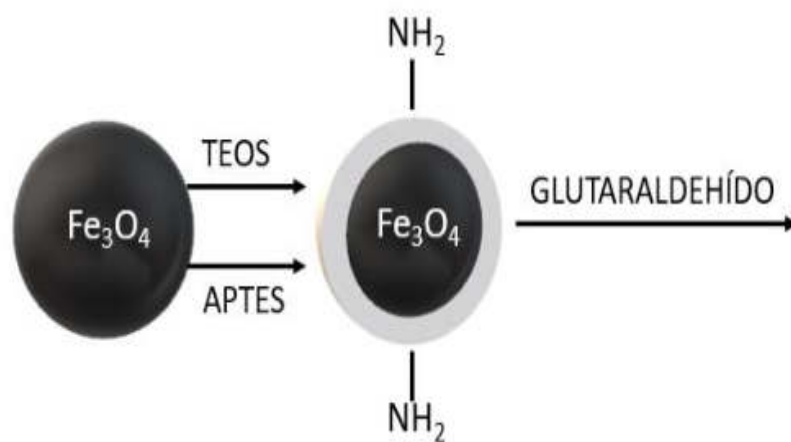
El mejoramiento en las propiedades de la enzima, así como la generación de enzimas recombinantes son un enfoque de interés en la fabricación de enzimas industriales, sin embargo, una desventaja que presentan las enzimas “libres” es la pérdida debido a la alta solubilidad, así como inestabilidad a diferentes condiciones operacionales por lo que se consideran difíciles de recuperar y la baja reutilización refleja un alto costo en la industria. Una tecnología alternativa es la inmovilización enzimática, definida como el confinamiento o localización en un espacio definido de la enzima y permitiendo el uso continuamente. La funcionalidad depende del método de inmovilización, así como del material acarreador, tradicionalmente, se realiza a través de métodos físicos como la encapsulación y atrapamiento en geles como alginatos, sin embargo, existe una alta probabilidad de degradación del material y una pérdida de la enzima mediante lixiviación lo que genera una baja recuperación enzimática. En la actualidad, la inmovilización química ha sido objeto

de estudio debido a la alta estabilidad que confiere a la enzima reduciendo la pérdida de sitios activos y otorgando una mayor resistencia al efecto de la temperatura, pH y algunos disolventes orgánicos, la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del material utilizado como soporte y la interacción entre los nucleófilos de la enzima, se requiere de interacciones químicas específicas y el uso de un agente de reticulación [27].

### **1.5.1 INMOVILIZACIÓN EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

En los últimos años se han desarrollado e investigado diferentes materiales como portadores en la inmovilización enzimática, entre ellos se encuentran las nanopartículas magnéticas, utilizadas como soporte por sus características fisicoquímicas como una baja toxicidad, biocompatibilidad y bajo costo, incluyendo la propiedad única de una recuperación eficaz y sencilla mediante campos magnéticos. El uso de nanopartículas magnéticas es reportado usualmente como acarreador en la biomedicina aumentando la eficacia con muy bajos niveles de toxicidad [28].

Las nanopartículas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (FIG. 4) [61] son ampliamente utilizados como material de inmovilización caracterizadas por una alta capacidad de magnetización y superficie específica. Debido a que las partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son fácilmente afectadas por reacciones de oxidación, es necesario realizar un proceso de recubierta, en donde las partículas de sílice resultan un excelente soporte para la inmovilización debido a su capacidad hidrófila, estable y biocompatible. Un paso posterior en la obtención del soporte sintetizado es la funcionalización de la nanopartícula, en donde generalmente se utilizan grupos funcionales como  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CH-CH}_2$ ; esta modificación química otorga un largo periodo de uso reduciendo la pérdida de la enzima inmovilizada [6].



**FIG. 4** Síntesis de nanopartículas modificadas químicamente

## 2. ANTECEDENTES

Se realizó una producción de pectinasas por *Aspergillus niger* LB-02-SF en cultivo sumergido, en donde se evaluó el efecto del inductor y la ausencia de glucosa en el medio como respuesta a una represión catabólica. En donde se observó una reducción de crecimiento de biomasa en el medio sin glucosa, pero una alta producción enzimática, registran una actividad enzimática mayor al 40% utilizando pectina sintética al 1% en el medio con respecto al control (14 U/mL), durante 22 horas de fermentación a pH de 2.5 [29].

A partir de un hongo *Penicillium chrysogenum* se obtuvo enzimas pectinolíticas en fermentación sólida, seleccionando cepas que produjeran un halo claro alrededor de la colonia inoculada siendo considerados como productores de pectinasas. La máxima actividad fue registrada a 50°C y pH 6.5 con una actividad enzimática de 27.1 U/L después de las 120 horas de fermentación. Se obtuvo un aparente peso molecular de 31 kDa determinado por SDS-PAGE [30].

Se optimizó la producción de pectinasa utilizando cáscara de naranja como cosustrato a partir de *Penicillium oxalicum* PJ02 en fermentación sumergida, utilizando un análisis de superficie de respuesta, los resultados obtenidos de un análisis de 22 experimentos indicaron una temperatura óptima de producción de 36.5 °C con una concentración de 1.12 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, en donde se obtuvo una actividad máxima de 36.88 U/mL y 0.62 U/mL para exo y endo-pectinasa respectivamente [24].

Se produjeron pectinasas por *Aspergillus niger* Aa-20, utilizando cáscara de limón como sustrato (1.6 g/L) obteniendo una actividad enzimática de 863.1 (U/mL), y la máxima actividad (2181.23 U/mL) a una concentración de sustrato de 0.8 g/L [19].

Se evaluó la actividad enzimática de pectinasas y las condiciones óptimas de producción a partir de *Aspergillus aculeatus*, inmovilizando por atrapamiento en alginato de calcio para la clarificación de jugo. El pH óptimo para la enzima libre fue 5.0 y 3.0 para la pectinasa inmovilizada, indicando una mayor estabilidad mediante el proceso de inmovilización a pH bajo. Las temperaturas óptimas para las



pectinasas libres e inmovilizadas fueron 50 y 40 °C, respectivamente, la temperatura baja en la pectinasa inmovilizada indica que el soporte no confiere un efecto de protección contra la desnaturalización enzimática a temperaturas más altas, la actividad enzimática se perdió por completo cuando se expuso a 60 °C/60 min. La pectinasa inmovilizada de *Aspergillus aculeatus* retuvo más del 80% de actividad residual en el tercer ciclo y más del 30% de la actividad residual después de repetir la reacción de hidrólisis de pectina ocho veces [8].

La inmovilización de pectinasas en nanopartículas magnéticas de quitosano fue evaluada utilizando polialdehído-dextrano como agente macromolecular de entrecruzamiento. La enzima inmovilizada indicó una estabilidad térmica en un rango de 55-75°C y una actividad residual del 85% después de cinco ciclos de uso. En el tratamiento de clarificación en jugo de manzana con enzima libre e inmovilizada se observó una reducción de turbidez del 70 y 74% respectivamente, después de 150 min de tratamiento evaluada mediante espectrometría [31].

Se inmovilizó enzimas pectinasas de *Penicillium oxalicum* F67 en microesferas magnéticas *cornstarch* utilizando glutaraldehído como agente *crosslinking*, manteniendo actividad residual de 60% después de 8 ciclos de uso en tratamiento de clarificación de jugos [32].

## 2.1 ANALISIS CRÍTICO DE LA LITERATURA

- Los hongos filamentosos *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* son los más reportados como productores de pectinasas, las cuales tienen una gran aplicación industrial para la clarificación de jugos.
- Se ha reportado que el uso de cáscaras de cítricos como cosustratos aumenta la producción de pectinasas.
- La inmovilización de pectinasas reduce costos de producción debido a que tienen varios ciclos de reúso, además le confiere a la enzima estabilidad térmica y a cambios de pH.

- Se ha reportado inmovilización de pectinasas principalmente por adsorción en microesferas magnéticas, por atrapamiento en alginato de calcio, en nanopartículas magnéticas de quitosano, con glutaraldehído por *cross-linking*. Sin embargo, no se ha inmovilizado pectinasas a partir de *Penicillium sp.* en nanoestructuras *core-shell* de magnetita y SiO<sub>2</sub> por enlace covalente.

## **2.2 APORTACIÓN CIENTÍFICA**

Producción e inmovilización de pectinasas con un hongo filamentoso en nanoestructuras *core-shell* de magnetita y SiO<sub>2</sub> por enlace covalente para la clarificación de jugos.

## **2.3 HIPÓTESIS**

Las pectinasas producidas con un hongo filamentoso e inmovilizadas en nanoestructuras *core-shell* de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>, reducen más del 70% la turbidez del jugo de manzana y naranja.

## **2.4 OBJETIVOS Y METAS**

### **2.4.1 OBJETIVO GENERAL**

Producir pectinasas con un hongo filamentoso e inmovilizar en estructuras *core-shell* de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> para la clarificación de jugo de naranja y manzana.

## 2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar morfológica y genéticamente al hongo filamentoso
2. Producir y optimizar la producción de pectinasas en cultivo sumergido variando la relación cosustrato/glucosa, temperatura y pH, midiendo como respuesta la actividad pectinolítica
3. Optimizar la actividad enzimática de pectinasas variando temperatura y pH mediante un diseño central compuesto
4. Determinar los parámetros cinéticos de la condición óptima de producción enzimática
5. Purificar parcialmente las pectinasas de un hongo filamentoso por tamaño molecular con membranas
6. Sintetizar, modificar y caracterizar el *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ , por DRX, IR-ATR, SEM y Potencial  $\zeta$
7. Inmovilizar las pectinasas de un hongo filamentoso en el *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ , variando tiempo de retención y concentración de enzima
8. Evaluar la actividad pectinolítica de las enzimas inmovilizadas para la clarificación de jugo de manzana y naranja

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA CEPA**

Se aisló una especie de hongo nativo encontrado en cáscara de naranja, sembrando mediante colección por asa estéril en medio de cultivo sólido PDA previamente esterilizado a 121°C/15 min, adicionando ciprofloxacino como antibiótico. Se incubó a 35°C durante 7 días, verificando su crecimiento cada 24 h. Las placas se almacenaron a 4°C para su posterior uso [33].

#### **3.2 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA**

La identificación morfológica del hongo aislado se realizó por la técnica de micro cultivo en microscopio óptico visualizando las características microscópicas a 100x y la descripción correspondiente a la morfología macroscópica del hongo sembrado en medio PDA [34]. Para la identificación genética del hongo se realizará la amplificación de la secuencia genómica ITS por medio de PCR siguiendo el protocolo establecido, la afiliación de las secuencias generadas será analizada por el algoritmo BLASTN de la base de datos del Genbank con un 97% de compatibilidad [34].

#### **3.3 PROPAGACIÓN DE ESPORAS**

La producción de esporas del hongo filamentoso se realizó en medio sólido PDA suplementado con 2% de pectina comercial (*Sigma Aldrich*) en condiciones estériles a 35 °C durante 7 días, posteriormente se tomó una asada y se suspendió en 10.0 mL de caldo SDA inoculando a 35 °C durante 5 días, a continuación, se realizó una dilución seriada 1:10 con una solución de NaCl 0.9% para determinar la concentración de esporas. Se tomó 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  y se cuantificó el

contenido de esporas mediante cámara de Neubauer. El crecimiento del hongo se determinó filtrando previamente por membrana *Millipore* 0.45  $\mu\text{m}$  y leyendo a 600 nm en UV-Vis para calcular la densidad óptica, todos los experimentos se realizaron por triplicado [35].

### 3.4 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

La producción de pectinasas se realizó por fermentación sumergida en medio mineral compuesto por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0.1 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.005 g/L) y glucosa 1% como medio control, variando el inductor: pectina sintética (*Sigma Aldrich*) 2% en peso seco, 2% peso seco de cáscara de naranja y cáscara de limón (2% peso/seco) previamente secadas, molidas y tamizadas. En condiciones estériles la fermentación se realizó a 35°C durante 240 horas de fermentación a 120 rpm, cada 24 horas se tomó una muestra para los análisis correspondientes, todos los experimentos se realizaron por triplicado [36].

#### 3.4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS

Se optimizaron las condiciones para encontrar la mejor producción de pectinasas con un diseño central compuesto  $2^2$ , tomando como variables independientes la temperatura y el pH (TABLA 4) y como respuesta la actividad enzimática máxima. Los datos fueron analizados mediante software *Desing Expert*.

**TABLA 4.** Variables independientes en el DCC de la producción enzimática

VARIABLES INDEPENDIENTES			$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
$X_1$	Temperatura	°C	20.85	25	35	45	49.14
$X_2$	pH	-	3.17	4.0	6.0	8.0	8.82

### 3.5 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA POR PESO SECO

Los extractos de enzimas obtenidos por fermentación sumergida se filtraron a través de papel Whatman no. 1 y en seguida a través de membrana *Millipore* (0.45 µM). La biomasa retenida en el papel Whatman se dejó secar hasta peso constante (ECUACIÓN 1) [37].

$$biomasa \left( \frac{g}{mL} \right) = \frac{peso\ inicial\ (g) - peso\ final\ (g)}{volumen\ muestra\ (mL)}$$

ECUACIÓN 1

### 3.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

#### 3.6.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Utilizando como estándar ácido tánico se construyó una curva de calibración (0 - 200 mg/L). Se tomó una muestra de 500 µL de la solución enzimática, se le añadió 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, 5.0 mL de agua destilada y 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se dejó reposar durante 2 horas y se leyó la absorbancia a 765 nm, todos los experimentos se realizaron por triplicado [38].

#### 3.6.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR

Se realizó una curva de calibración con una concentración de 129 - 1500 µg/mL utilizando albumina sérica como estándar. A 10.0 µL de la solución enzimática se le agregó 250 µL de reactivo Bradford 0.1 M, dejando reposar 10 minutos se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm para determinar el contenido de proteína extracelular [39].

### **3.6.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

La actividad enzimática de las exo-PG se determinó mediante la cuantificación de azúcares reductores por el método DNS, en donde se añadió 500  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático a 1.0 mL en buffer de citratos (pH 5.0) y 100  $\mu\text{L}$  de solución de pectina sintética al 1%, después de incubar a 35°C por 25 min a 500  $\mu\text{L}$  de la solución incubada se le añadió 41.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%, 500  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS y 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada llevando a 100°C durante 10 min, en seguida se dejó enfriar y se leyó la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como el aumento de ácido galacturónico producido ( $\mu\text{mol}$ ) por mL de pectinasas por minuto, determinada mediante una curva estándar con ácido D-galacturónico [40]. La actividad endo-PG se cuantificó mezclando 500  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 9.0 mL de solución pectina al 2% en buffer de citratos 0.1 M (pH 5.0), posteriormente se incubó a 35°C durante 30 min; la reducción de la viscosidad se determinó mediante viscosímetro capilar Ostwald. Una unidad de actividad endo-pectinasa (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la viscosidad en un 50% en 1 min por mililitro [41].

### **3.7 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA**

En condiciones óptimas de la producción en fermentación sumergida para la producción enzimática, se realizó un diseño central compuesto  $2^2$  variando la temperatura y el pH (TABLA 5) tomando como respuesta la actividad enzimática del extracto extracelular [42].

**TABLA 5.** Variables utilizadas para DCC optimización de la actividad enzimática

VARIABLES INDEPENDIENTES			- $\alpha$	-1	0	1	+ $\alpha$
$X_1$	Temperatura	°C	25	35	45	55	49.14
$X_2$	pH		0.75	2.0	5.0	8.0	9.24

### 3.8 PURIFICACIÓN PARCIAL ENZIMÁTICA

#### 3.8.1 ULTRAFILTRACIÓN

La purificación parcial del extracto enzimático se llevó a cabo primeramente mediante membrana de corte *Amicon* 50 kDa con el objetivo de concentrar la proteína de interés, en donde se añadió 15.0 mL del extracto crudo previamente filtrado a 0.45  $\mu$ m llevando a centrifugación a 4500 rpm durante 30 min a 4°C y se colectó la fracción filtrada (<50 kDa). Se determinó la actividad enzimática y el contenido de proteína extracelular, así como el rendimiento obtenido de la fracción recuperada [6].

#### 3.8.2 PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

La fracción colectada (<50 kDa) se llevó a un tratamiento de precipitación con sulfato de amonio, llevando la solución al 80% en agitación constante a 4°C, se dejó reposar durante 12 horas y posteriormente se centrifugó a 4500 rpm/ 30 min a 4°C, el sobrenadante fue recuperado para realizar una segunda precipitación. El precipitado obtenido se diluyó con buffer de citratos de pH 5.0 (1M) y se llevó a centrifugación a las mismas condiciones. El sobrenadante se dializó en buffer de citratos (pH 5) a 4°C hasta la eliminación de todos los iones sulfato, se determinó el contenido de proteína extracelular y la actividad enzimática [6].



### 3.8.3 CROMATOGRAFÍA EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

Se utilizó una columna de vidrio (35 x 1.5 cm, con volumen de 50 mL) empacada con *Sephadex G-100* (*Sigma Aldrich*). El concentrado fue eludido con buffer Tris-HCl (10 mM, pH 6.5). Se colectaron 25 fracciones de 2.0 mL de volumen, fueron concentradas nuevamente utilizando membrana de ultrafiltración de 30 kDa con el propósito de reconcentrar la fracción en donde se encuentran las pectinasas, se determinó el contenido de proteína extracelular y actividad enzimática, la fracción con actividad más alta se colectó para análisis posteriores [43].

### 3.8.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se realizó la técnica SDS-PAGE al 12% utilizando gel acrilamida al 30%, como control se analizó una muestra de pectinasa de *A. niger* (*Sigma Aldrich*) y se evaluaron las fracciones enzimáticas (Extracto filtrado 0.45  $\mu$ m, <50 kDa, fracción cromatográfica), el gel fue corrido a 110 V durante 15 min y posteriormente a un voltaje constante de 140 V durante 2 horas [43].

## 3.9 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Se evaluó el efecto de la concentración del sustrato (0.0 – 2.5 mg/mL) con respecto a la actividad catalítica de la fracción enzimática ultrafiltrada (<50 kDa) ( $\mu$ Mol/min) utilizando la ecuación de Michaelis-Menten se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  del extracto enzimático crudo, la fracción ultrafiltrada, pectinasas comerciales, celulasas comerciales (*A. niger*, *Sigma Aldrich*) y de la fracción enzimática (<50 kDa) inmovilizada en nanopartículas *core-shell*, la datos fueron analizados y ajustados utilizando el software *Origin Pro-2016* [44].

### 3.10 SÍNTESIS DE LA NANOESTRUCTURA $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ Y MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA SUPERFICIE

Las nanopartículas magnéticas se adquirieron comercialmente, se agregaron 500 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a una suspensión con etanol absoluto y agua desionizada, se sonicaron durante 45 minutos y se añadió una mezcla de solución de hidróxido de amonio al 20% y 4.0 mL de reactivo TEOS, dejando en agitación constante la mezcla durante 6 horas a 28°C, posterior a este tiempo se recuperaron las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  (*core-shell*) por campo magnético y se dejó secar a vacío durante 12 horas a 80°C.

Para realizar la modificación química de superficie (*core-shell* aminado), se tomó 0.5 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  y se añadieron a una mezcla de tolueno (40 mL) y de reactivo APTES (5.0 mL) agitando manualmente, la mezcla se dejó a 60°C durante 14 horas bajo agitación constante, posteriormente se lavó la mezcla con tolueno y dos veces con acetona, las nanopartículas fueron recuperadas mediante campo magnético y se secaron a vacío durante 24 h a 50°C [45], [46].

El enlace covalente de unión entre la nanopartícula y la enzima se formó utilizando una solución de glutaraldehído al 25%, agregando 15 mg del *core-shell* aminado y agitando a temperatura ambiente durante 1 h a 120 rpm, posteriormente se lavó extensivamente con  $\text{H}_2\text{O}$  y se secó a vacío a 50°C durante 24 h [47].

#### 3.10.1 CARACTERIZACIÓN DEL *CORE-SHELL* $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

La caracterización del *core-shell* fue determinada utilizando diferentes técnicas evaluando tanto la morfología como las propiedades fisicoquímicas durante cada fase de síntesis.

### **3.10.1.1 SEM**

El tamaño y la morfología, así como la distribución de las nanopartículas fueron evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) JEOL (modelo JSM-6701F) con un voltaje de 5.0 kV y una magnificación de 1000x a 50000x. Utilizando este mismo equipo se realizó un análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) en donde se determinó la composición elemental del soporte sintetizado [48].

### **3.10.1.2 POTENCIAL $\zeta$**

Evalutando el potencial  $\zeta$  se determinó la carga superficial de las nanopartículas, permitiendo inferir las correctas reacciones de síntesis del core-shell, se utilizó un equipo Zetasizer ver 7.12, en donde se analizaron muestras de cada fase dispersas en agua desionizada (pH 6.55, IR: 1.33, 0.887 cP) [48].

### **3.10.1.3 DIFRACCIÓN DE RAYOS X**

La difracción de rayos X se utilizó para observar la fase cristalina de la nanopartícula en las diferentes etapas de síntesis y determinar si se comportaba estable de acuerdo con las características de la magnetita. El equipo usado fue un Difractómetro de Rayos X Siemens D-5000, analizando la muestra a temperatura ambiente durante 30 min en un ángulo de 5 a 90° (35 kV) [49].

#### **3.10.1.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON ATR-FTIR**

Se utilizó la técnica de espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (Perkin Elmer mod. Spectrum One) para observar los enlaces correspondiente a la silinización, así como a la funcionalización del soporte con el grupo amino. El análisis se realizó a temperatura ambiente, el parámetro de onda fue de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  [49].

#### **3.10.1.5 XPS**

La composición química de la superficie del material sintetizado fue evaluada por medio de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) (X-Ray 400um FG) [50].

### **3.11 INMOVILIZACIÓN DE PECTINASAS PARCIALMENTE PURIFICADAS**

La inmovilización de las pectinasas se realizó bajo las condiciones óptimas de mayor actividad enzimática, determinando la actividad pectinolítica antes y después de inmovilizar. Variando la concentración de enzima inicial en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de citratos (01 M, pH 5.0), añadiendo 15.0 mg del *core-shell* aminado y llevando a sonicación durante 5 min, la mezcla se dejó reposar durante 1 hora a 4°C y posterior a este tiempo se sónica nuevamente, repitiendo este ciclo dos veces y finalmente dejando reposar a temperatura ambiente. El *core-shell* unido a la enzima pectinolítica se recuperó mediante campo magnético y se lavó dos veces con agua desionizada, se tomó una muestra del sobrenadante para análisis de proteínas extracelular [51].

Se realizó un diseño central compuesto de dos factores para conocer las condiciones óptimas para la actividad enzimática inmovilizada (TABLA 6).

**TABLA 6.** Variables utilizadas en DCC optimización de las actividad enzimática inmovilizada

VARIABLES INDEPENDIENTES			- $\alpha$	-1	0	1	+ $\alpha$
$X_1$	Temperatura	°C	29.82	35	50	60	65.17
$X_2$	pH	-	1.37	2.0	3.0	5.0	5.62

### 3.12 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA DE ENZIMAS INMOVILIZADAS EN LA CLARIFICACIÓN DE JUGOS

El jugo de manzana y naranja se elaboró con fruta obtenida de mercado local, lavada y cortada previamente, obteniendo el jugo mediante extractor casero. Se realizó un proceso de esterilización llevando a 90°C por 15 min y posteriormente a 4°C, se centrifugó a 6500 rpm por 15 min y posteriormente se filtró por papel Whatman no. 1.

El tratamiento de clarificación se llevó a cabo mediante métodos mecánicos (centrifugación a 8000 rpm/ 15 min) y el tratamiento enzimático (pectinasas inmovilizadas y libres) en actividades catalíticas similares. Se tomó 15 mL de los diferentes jugos y se añadió 500  $\mu$ L de extracto enzimático, utilizando agua destilada como control, se llevó a agitación constante a 1200 rpm durante 1 hora a 35°C, posteriormente se tomó una muestra para determinar el grado de turbidez midiendo % T a 660 nm.

Para determinar la capacidad de reúso, se recuperaron las pectinasas inmovilizadas bajo campo magnético lavando con buffer de citratos (pH 5.0) repitiendo tres veces el ciclo antes mencionado.

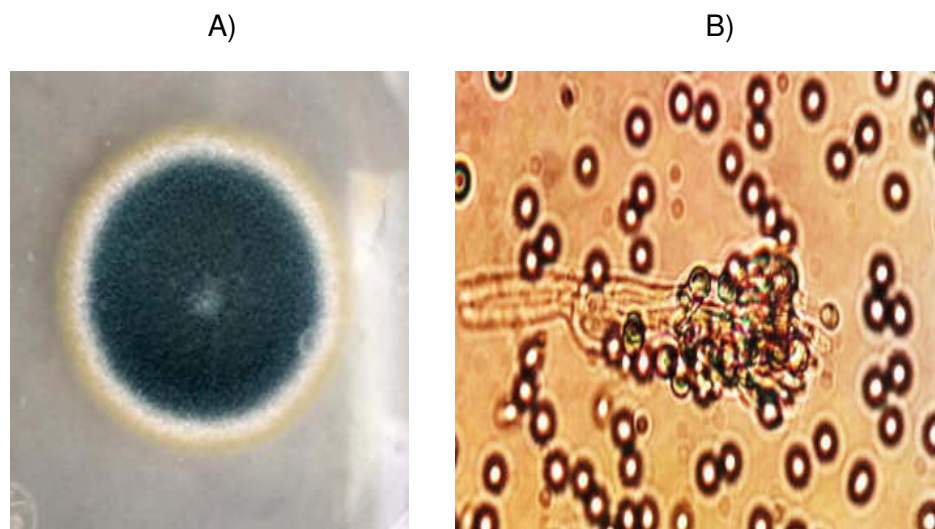
La viscosidad de los jugos fue medida utilizando viscosímetro de Ostwald, las muestras se trataron de la misma forma descrita para la evaluación de turbidez [32].[52].

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 AISLAMIENTO DE LA CEPA E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Se logró aislar una cepa de hongo encontrada en cáscara de naranja mediante resiembras en medio PDA a 35°C, el inóculo del hongo fue caracterizado morfológicamente.

La colonia fúngica inoculada en medio de cultivo (FIG. 5 A), presentó una coloración verde, forma circular y presencia de esporas. Mediante la técnica de micro cultivo se observó las estructuras microscópicas del hongo filamentoso (FIG. 5 B), en donde se presentó similitud a la perteneciente al género *Penicillium sp.*, el cual se caracteriza por contener conidióforos peniciliados terverticilados coincidiendo con las tres ramificaciones lanceoladas y simétricas en el hongo analizado, así mismo, se observó la presencia de esporas y conidios en forma de cadenas basípetas, esféricas y verdosas propias al género mencionado [30].

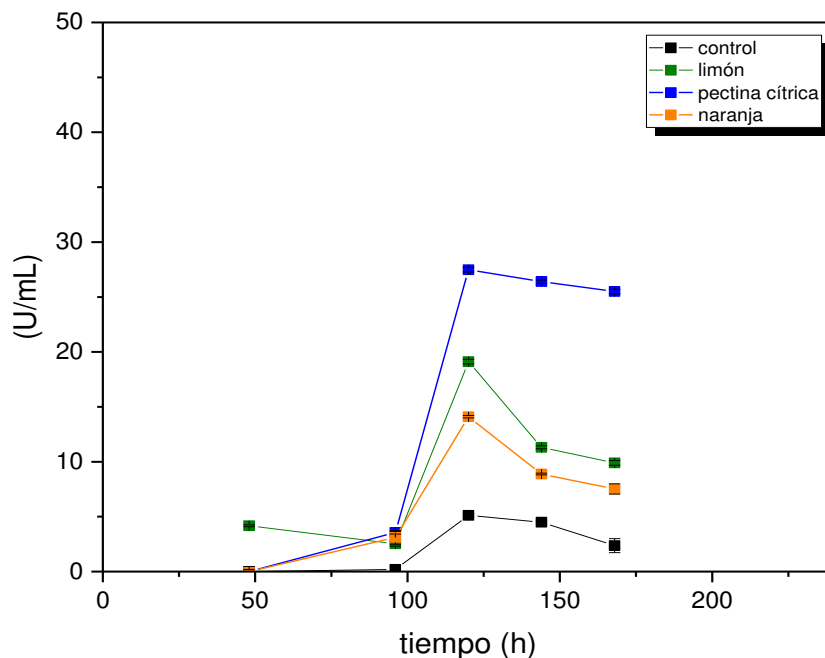


**FIG. 5** A) Características macroscópicas del hongo filamentoso aislado en PDA. B) Características microscópicas observadas con microscopio óptico a 100X

## 4.2 PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA

Se realizó una prueba de hidrólisis de la cadena péctica en donde se inoculó el hongo filamentoso en medio PDA suplementado con 2% de pectina cítrica. Se presentó un halo claro de 0.2 cm después de 5 días de incubación posterior a una tinción con rojo congo al 1%, evidenciando la capacidad del hongo filamentoso de degradar los compuestos pécticos presentes en el medio de cultivo (ANEXO I). El resultado coincide con lo reportado en literatura en donde *Aspergillus niger* presenta un halo de hidrólisis de 0.5 cm en condiciones similares, por lo tanto se deduce que el hongo utilizado en este proyecto presenta la capacidad de producir enzimas pectinolíticas [53]. Posteriormente, se llevó a cabo la producción enzimática mediante fermentación sumergida utilizando cáscaras de cítricos como cosustratos, pectina cítrica 2% y medio mineral como control (FIG. 6 A). Se observa que la mayor producción exo-enzimática fue a las 120 h de fermentación tanto en el medio control como en cosustratos pécticos, coincidiendo con los resultados obtenidos en trabajos anteriores donde al mismo tiempo de fermentación *P. chrysogenum* presentó una actividad enzimática de 27.1 U/mL a 50°C y pH 6.5 [30].

A)



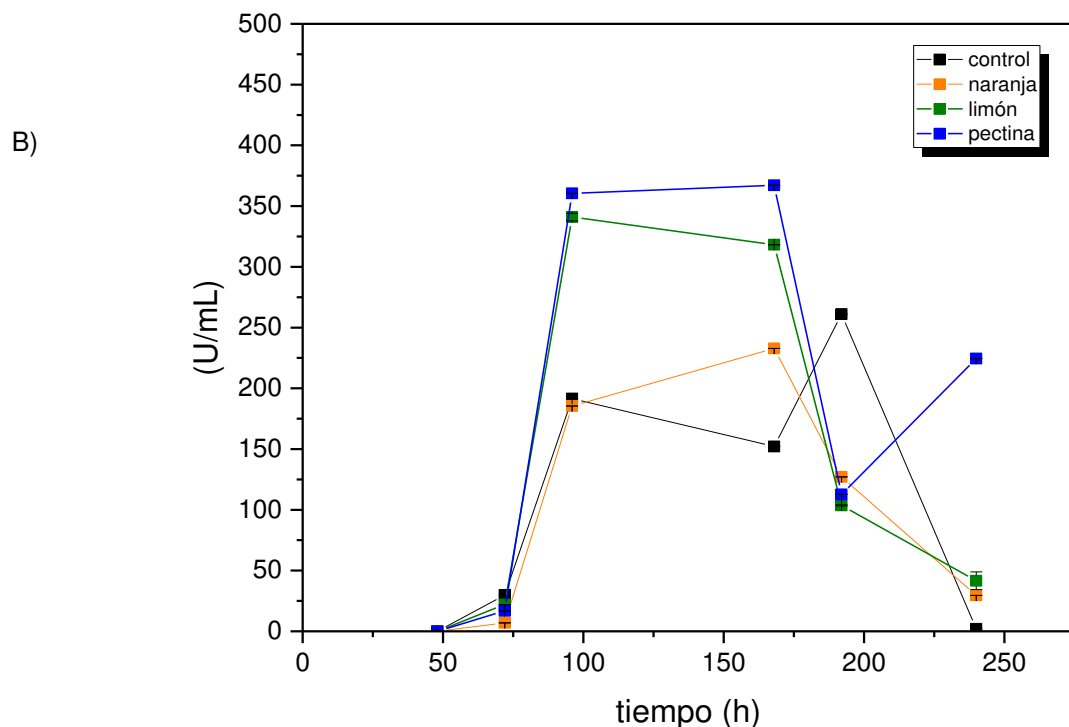
Se registraron unidades cinco veces mayor en medio con pectina cítrica 2% (27.8 U/mL) en comparación al medio control (4.87 U/mL), señalando la importancia del uso de inductor el cual dio como resultado un aumento de la producción de enzimas pectinolíticas y la represión catabólica en presencia de glucosa en el medio control, el aumento en el porcentaje de la actividad enzimática en el medio inducido coincide con lo reportado en pectinasas producidas por *Penicillium oxalicum* PJ02 (33.17 U/mL) con pectina cítrica 2%. La producción enzimática en la que se utilizó cáscara de limón como cosustrato fue 1.5 veces más alta en contraste con cáscara de naranja, resultado atribuido a la estructura química de la pectina en las cáscaras de los cítricos [24].

La cepa fúngica fue pretratada con el fin de adaptar al hongo en condiciones similares a la fermentación y en presencia de compuestos pécticos en base a los resultados obtenidos durante la producción enzimática previa y lograr un efecto inductor de enzimas pectinolíticas; por lo que la siembra del inóculo en medio PDA fue suplementada con pectina cítrica al 2% y posterior al tiempo de incubación se suspendió en caldo SDA a 35°C. Mediante conteo de esporas en cámara de



Neubauer y densidad óptica, se fijó una concentración de inóculo de  $1.6 \times 10^6$  esporas/mL, empleada para todos los cosustratos utilizados en la producción enzimática. Una alta concentración de esporas utilizada para inocular medios de cultivos resulta en un efecto negativo para la producción enzimática debido a una sobresaturación enzimática y una baja concentración de sustratos lo cual impide el crecimiento del hongo e incremento de biomasa [2].

Controlando las variables utilizadas (temperatura, pH y concentración de inóculo) se realizó una segunda fermentación sumergida utilizando los mismos cosustratos excepto por la pectina comercial, reemplazada por pectina extraída de la cáscara de limón utilizada. La extracción péctica fue realizada mediante hidrólisis ácida [54], obteniendo un rendimiento del 80% con respecto al total de la cáscara empleada. Los resultados obtenidos mediante la fermentación sumergida posterior al pre-inóculo del hongo (FIG. 6 B), muestran una reducción en la fase exponencial efecto atribuido a la adaptación del hongo a condiciones de temperatura y pH y a la predisposición por degradar compuestos pécticos como los galacturonatos presentes en el medio de fermentación, disminuyendo en el tiempo de producción enzimática (96 h) comparando con la primera fermentación (120 h).



**FIG. 6** A) Producción enzimática a 35°C por 168 h de fermentación. B) Producción enzimática en fermentación sumergida posterior a la adaptación del hongo

La inducción enzimática es definida como la síntesis o el aumento de generación de enzimas específicas debida a la presencia de sustratos en el medio o estímulos en el medio ambiente, este efecto es regulado generalmente sobre el nivel transcripcional y el ARNm del microorganismo. En diversos estudios se ha comprobado el aumento en la expresión de genes de enzimas pectinolíticas en el género *Aspergillus niger* en presencia de ácido D-galacturónico y otros compuestos pécticos [29]. La actividad enzimática se incrementó aproximadamente 10 veces más con respecto a la fermentación anterior, nuevamente relacionado con la capacidad inductora de pectinasas. Los valores alcanzados fueron de 360.45 U/mL, lo que es similar a los valores de actividad enzimática producida a partir de especies hiper productoras de pectinasas de *Penicillium occitanis* CT1 que presentó una actividad de 221 U/mL [55].

Evaluando el rendimiento de producción de enzimas de los agro residuos utilizados como cosustratos durante la fermentación sumergida, la cáscara de limón resulto ser la mejor fuente de carbono para el hongo filamentoso alcanzando una actividad máxima de 340.9 U/mL, aproximadamente dos veces más a la obtenida a partir de cáscara de naranja (198.4 U/mL) al tiempo máximo de producción. La variación de la actividad enzimática se presenta de acuerdo con la estructura de la pectina presente en las cáscaras, lo que explica la diferencia entre los valores obtenidos. De acuerdo con la literatura la cáscara de naranja presenta un alto grado de compuestos metílicos en comparación a la cáscara de limón (70 y 50% respectivamente), un alto grado de compuestos ésteres metílicos refleja una baja efectividad en el rompimiento de la cadena polimérica por medio de reacciones de hidrólisis. Así mismo, el tipo de enzimas predominantes en el género *Penicillium* son las poligalacturonasas (PG), las cuales son encargadas de hidrolizar polisacáridos pécticos, el bajo grado de esterificación permite al hongo filamentoso analizado en este trabajo degradar en mayor proporción la cadena pectica de la cáscara de limón utilizado como fuente de carbono en la fermentación sumergida [3][30].

Al tiempo de producción enzimática máxima y utilizando cáscara de limón como cosustrato se determinó la actividad de las endo-PG (TABLA 7). Se observó que el aumento de la endo actividad se presenta a las 120 horas de fermentación con un valor máximo de 2.92 U/mL, este resultado puede estar basado a la naturalidad del hongo debido a que se ha reportado que los *Penicillium*, liberan primero las enzimas (exo-pectinasas) encargadas de degradar las macromoléculas encontradas en el medio, para introducirlas a través de la membrana y la pared celular del hongo, posteriormente con la acción endo-enzimática para aprovechar los metabolitos de bajo peso molecular como nutrientes [33]. La actividad endo-enzimática determinada por el hongo analizado coincide con datos registrados en estudios anteriores, *P. frequentas* alcanzó una actividad máxima de 2.95 U/mL en medio suplementado con pectina sintética 0.5% y *Penicillium sp.* CGMCC 1669, especie modificada genéticamente para hiper producir pectinasas presentando una actividad dos veces mayor (6.2 U/mL) en medio suplementado con 0.5% de pectina sintética [56] [41].

**TABLA 7.** Actividad endo-pectinolítica producida en fermentación sumergida

<b>TIEMPO</b>	<b>ENDO-PECTINASAS</b>
(h)	(U/mL)
0	0
96	1.586
120	2.926
144	1.526

#### **4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA**

Se realizó un análisis estadístico ANOVA (TABLA 8) de una vía, variando los cosustratos y como respuesta la producción enzimática, con una  $R^2$  mayor a 0.95

indicando un ajuste adecuado del modelo estadístico utilizado. Se evaluaron las unidades de actividad pectinolítica al tiempo máximo de producción en fermentación (96 h) en donde los resultados muestran diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre los cosustratos utilizados en el medio suplementado.

**TABLA 8.** Resultados del ANOVA variando los cosustratos utilizados,  $R^2$  0.96

	DF	SUMA DE CUADRADOS	MC	F	P>F
Modelo	3	76630.31	25543.43	80.05	2.62E-6
Error	8	2552.66	319.08		
Total	11	79182.97			

Con el fin de identificar estadísticamente el cosustrato que generó mayor producción enzimática se utilizó una prueba Tukey. De acuerdo con los resultados observados en el análisis estadístico (TABLA 9) en donde se evaluó la actividad máxima comparando los cosustratos evaluados, no existe diferencia significativa entre la actividad generada en el medio compuesto por pectina extraída de la cáscara de limón y el cosustrato de la cáscara de limón completa, indicando que el porcentaje de pectina en cáscara de limón es significativamente mayor y por lo tanto no es necesario realizar un proceso de extracción para obtener un resultado eficiente durante este proyecto. Por otro lado, se observó diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre los medios utilizando cáscara de limón y naranja como fuente de carbono, deduciendo que el primero fue el mejor cosustrato con efecto inductor obteniendo un mayor rendimiento de producción enzimática.

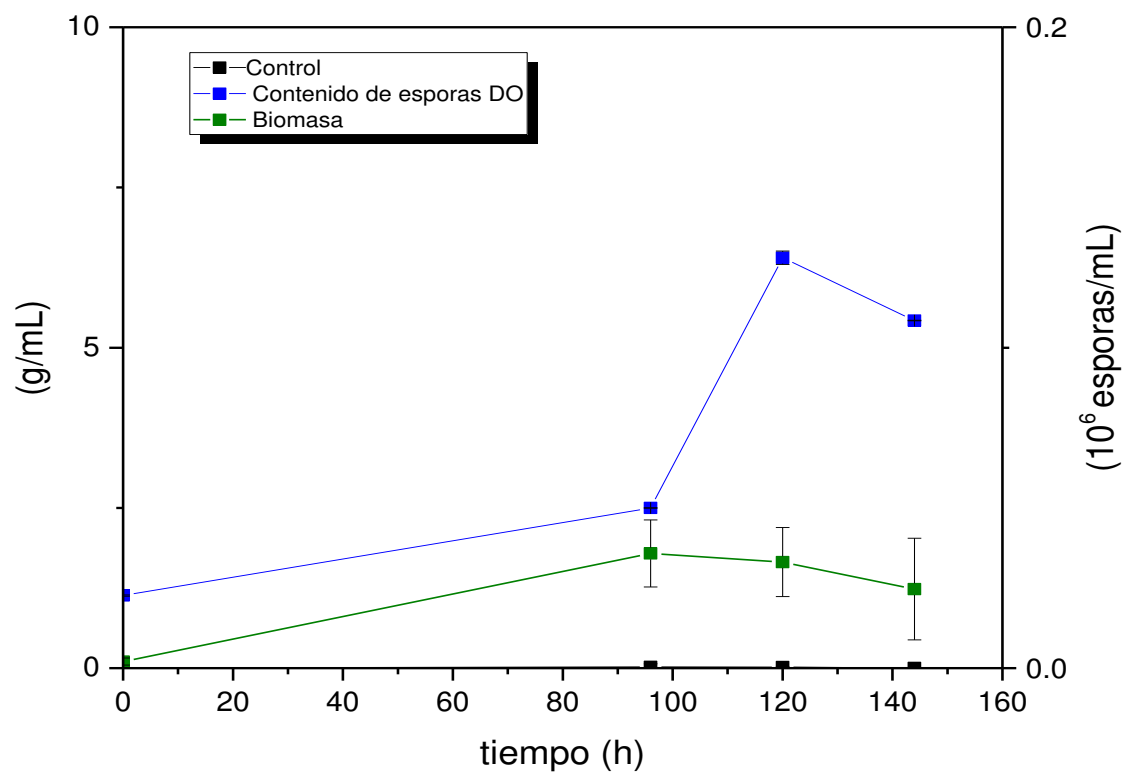
**TABLA 9.** Resultados prueba de Tukey producción de pectinasas

MEDIOS	DIFERENCIA DE CUADRADOS	q Valor	Alfa	Sig
--------	-------------------------	---------	------	-----

Pectina de limón - Control	186.57	18.09	0.05	1
Limón - Control	154.91	15.02	0.05	1
Limón - Pectina de limón	-31.65	3.06	0.05	0
Naranja - Control	27.36	2.65	0.05	0
Naranja - Pectina de limón	-159.20	15.43	0.05	1
Naranja - Limón	-127.55	12.36	0.05	1

#### 4.4 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA Y DENSIDAD ÓPTICA

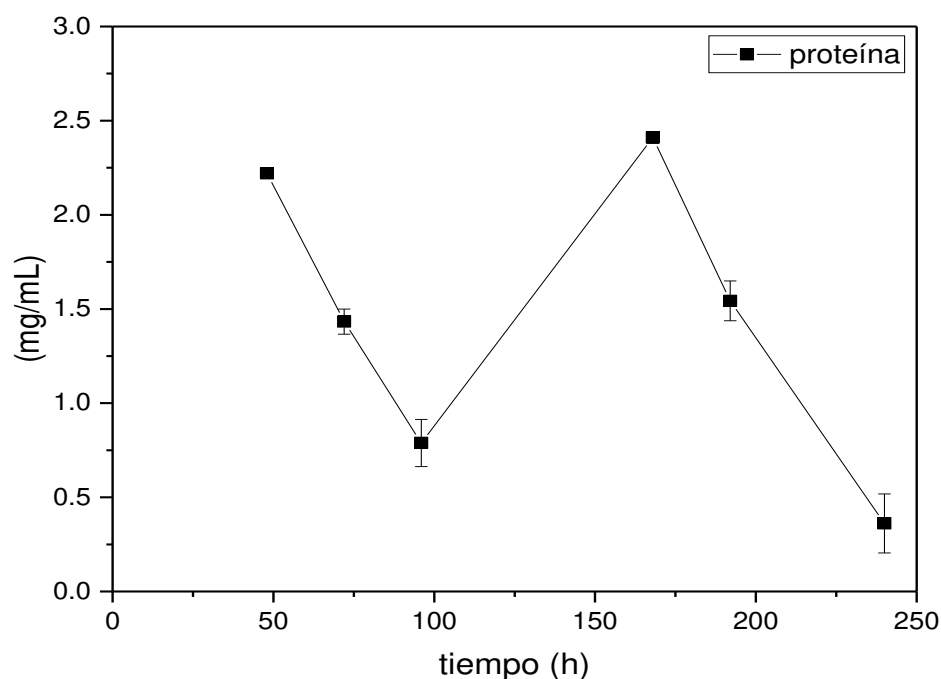
La producción de biomasa (g/mL) a partir del hongo filamentoso en función del tiempo de fermentación (FIG. 7), registró la mayor concentración de biomasa a las 96 h, presentando una diferencia aproximadamente del 80% entre el medio con cosustrato de cáscara de limón y el control; los valores obtenidos coinciden con los reportados en la literatura, en donde *Aspergillus niger* LB-02-SF registró el valor de biomasa máximo a las 72 h de fermentación en medio compuesto por 5 g/L glucosa, 5 g/L sulfato de amonio y 500 mL/L de extracto de salvado de trigo, con una diferencia del 16% en medio con ausencia de glucosa como fuente de carbono [29]. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante densidad óptica, se observa que la concentración máxima se registra a las 120 horas de fermentación. Tomando en cuenta el punto máximo de biomasa se puede deducir que el hongo (96 h) se encuentra en su fase exponencial, alcanzando el nivel más alto de crecimiento del hongo filamentoso, ya que los hongos esporulados generan los metabolitos secundarios posterior al crecimiento natural del hongo se deduce que la fase de latencia en este experimento se presentó a las 120 horas de fermentación sumergida [22].



**FIG. 7** Determinación de la biomasa y densidad óptica por fermentación sumergida

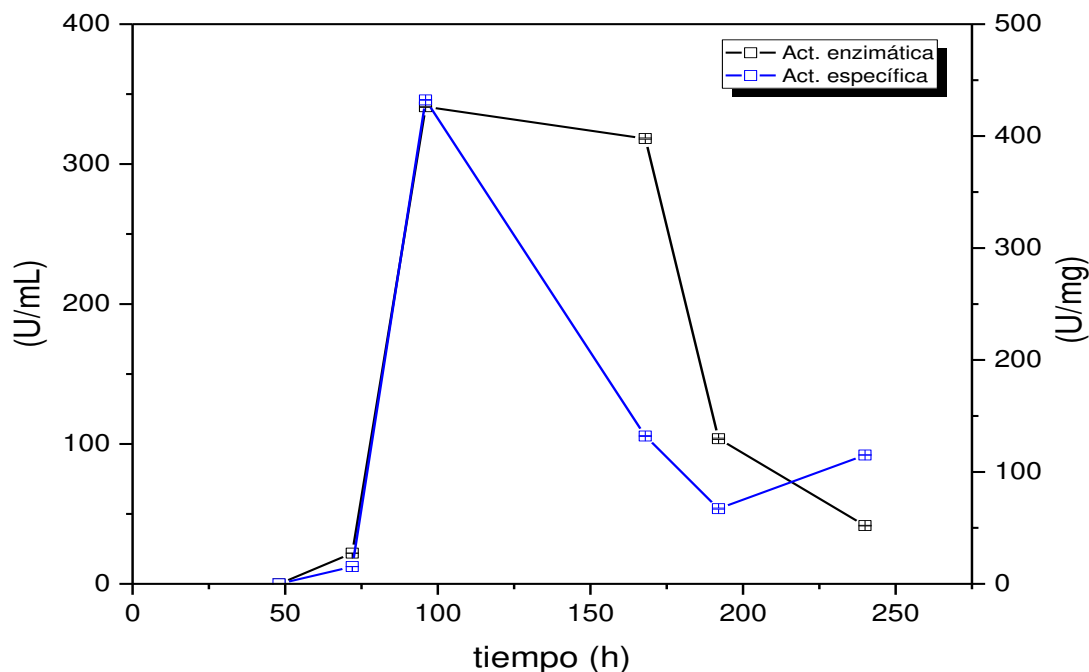
#### 4.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA

El contenido de proteína extracelular (FIG. 8) obtenido en medio con cáscara de limón a las 96 h de fermentación fue  $0.788 \pm 0.12$  mg/mL, se observa que la actividad enzimática máxima no se presenta al mismo tiempo que la concentración más alta de proteína extracelular ( $2.41 \pm 0.030$  mg/mL), sin embargo, de acuerdo con la determinación de la actividad específica (FIG. 9), en donde el valor máximo (432.34 U/mg) coincide con la mayor actividad pectinolítica indicando que el hongo analizado produce una alta concentración de pectinasas, ya que a mayor grado de pureza enzimática la actividad específica aumenta [56][3].



**FIG. 8** Proteína extracelular producida en fermentación sumergida a 240 h de utilizando cosustrato de cáscara de limón





**FIG. 9** Cuantificación de la actividad enzimática (U/mL), la actividad específica (U/mg) producida en fermentación como cosustrato cáscara de limón

#### 4.5.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

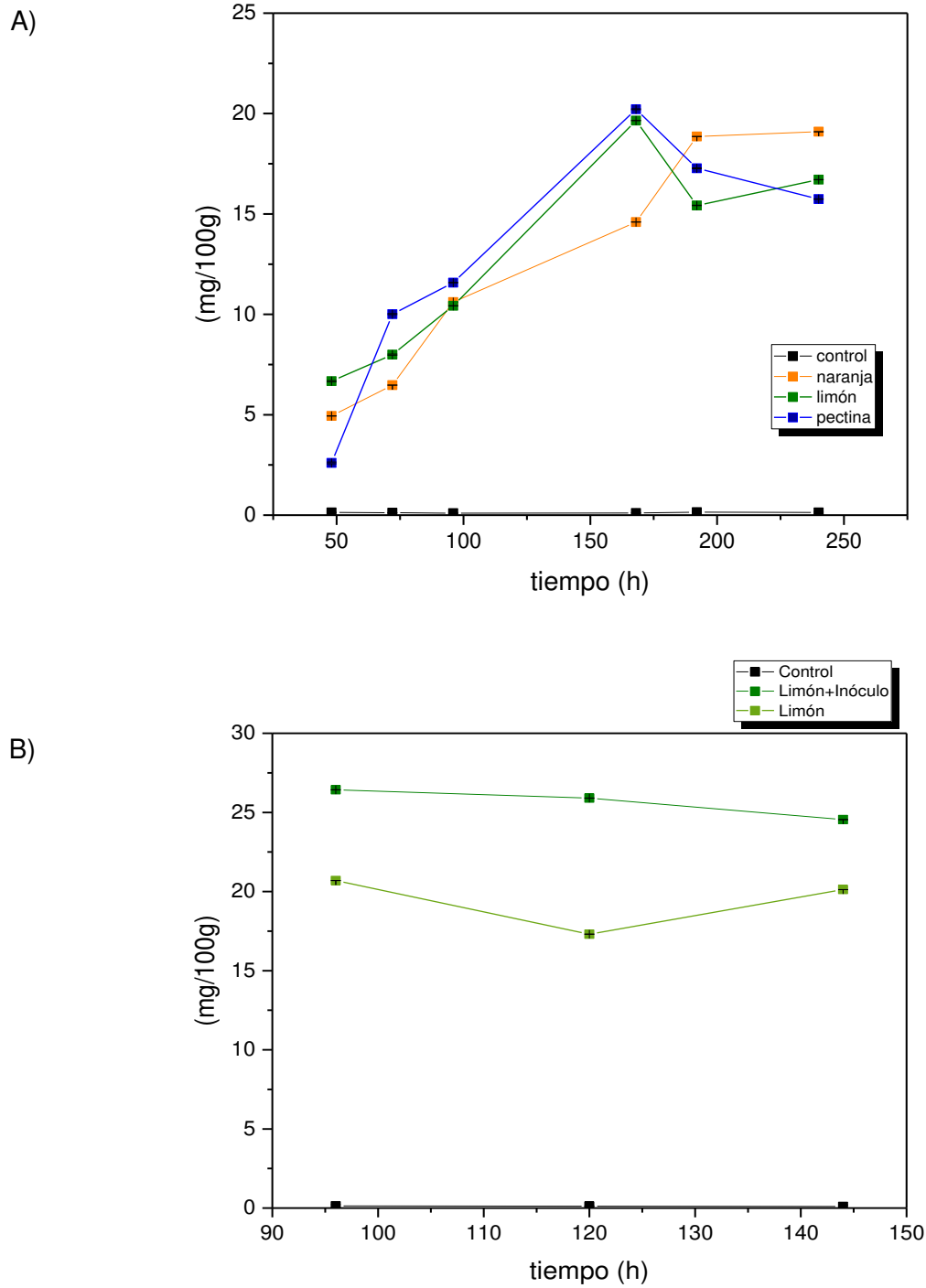
De acuerdo con la literatura, los compuestos fenólicos cumplen una función de protección en la planta inhibiendo enzimas fúngicas, simultáneamente podrían ocurrir reacciones de oxidación produciendo una desnaturalización proteica, lo cual podría explicar los resultados obtenidos (FIG. 10 A), en donde el mayor contenido de compuestos fenólicos se presentó a las 168 h, a este mismo tiempo de fermentación la actividad enzimática disminuye, este mismo efecto se observó en *Penicillium chrysogenum* CCDCA10756 con enzimas xilanasas en donde la disminución de la actividad se atribuye a la interacción de aminoácidos expuestos a compuestos fenólicos, provocando una desnaturalización de la enzima [57]. Sin embargo, este efecto no es el mismo en todas las enzimas y especies productoras, ya que existen reportes de enzimas altamente activas en presencia de fenoles,

como es el caso en pectinasas generadas por *Fusarium oxysporum* en donde se presentó mayor actividad en presencia de ácido gálico [58].

El contenido de fenoles totales presentes en cítricos varía de acuerdo al tamaño y especie, en estudios anteriores se han registrado valores entre  $21.17 \pm 0.64$  y  $190 \pm 10.6$  mg/ 100 g en limón eureka y limón dulce respectivamente, coincidiendo con lo determinado en el medio suplementado con cáscara de limón sin inóculo (20.69 mg/100g de cáscara) [59].

Los compuestos fenólicos que mayoritariamente inhiben a las pectinasas producidas por *P. chrysogenum* CCDCA10756 son el ácido tánico, ácido transferúlico y ácido 4-hidroxi benzoico en concentraciones de 0.1 a 0.2 mg/mL [57]. Se registra en estudios previos una concentración de 0.287  $\mu$ g/mL de ácido hidroxibenzoico en limón (*Citrus lemon*), aunque la cantidad presente en cáscara de limón es baja a los niveles de inhibición reportados anteriormente, es necesario mencionar que durante la cosecha y el almacenamiento de frutos se utilizan diferentes químicos para conservar a los alimentos y reducir la contaminación bacteriana y fúngica; el benzoato sódico es un derivado químico altamente utilizado por su nulo efecto nocivo a las personas y es efectivo en condiciones ácidas, generalmente pH < 4.0 actuando ampliamente en hongos con una concentración de inhibición entre 0.05 – 0.1% sobre diversas enzimas que regulan el metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa [60]. Estos factores podrían explicar los resultados obtenidos durante la producción enzimática y la relación entre los compuestos fenólicos presentes.

Se realizó una determinación de fenoles totales presentes en medio suplementado con cáscara de limón sin inóculo enzimático como control (FIG. 10 B), en donde se observó una diferencia del 22% comparado con el medio con inóculo, *Penicillium sp.*, tiene la capacidad de producir compuestos fenólicos principalmente limoneno, el cual podría generarse durante la fermentación explicando los resultados obtenidos, sin embargo, es necesario realizar una determinación cualitativa para corroborar dicha información [30].



**FIG. 10** A) Fenoles totales presentes en fermentación sumergida utilizando diferentes cosustratos. B) Comparación entre los compuestos fenólicos presentes en medio con cáscara de limón con y sin inóculo

## 4.6 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

Los resultados del diseño experimental tomando como respuesta la actividad enzimática (TABLA 10) se ajustaron con una ecuación polinomial de segundo orden (ECUACIÓN 2) y se calculó el modelo cuadrático por medio del software *Desing Expert*, así mismo fue realizado el análisis de varianza ajustado al modelo para las variables establecidas anteriormente.

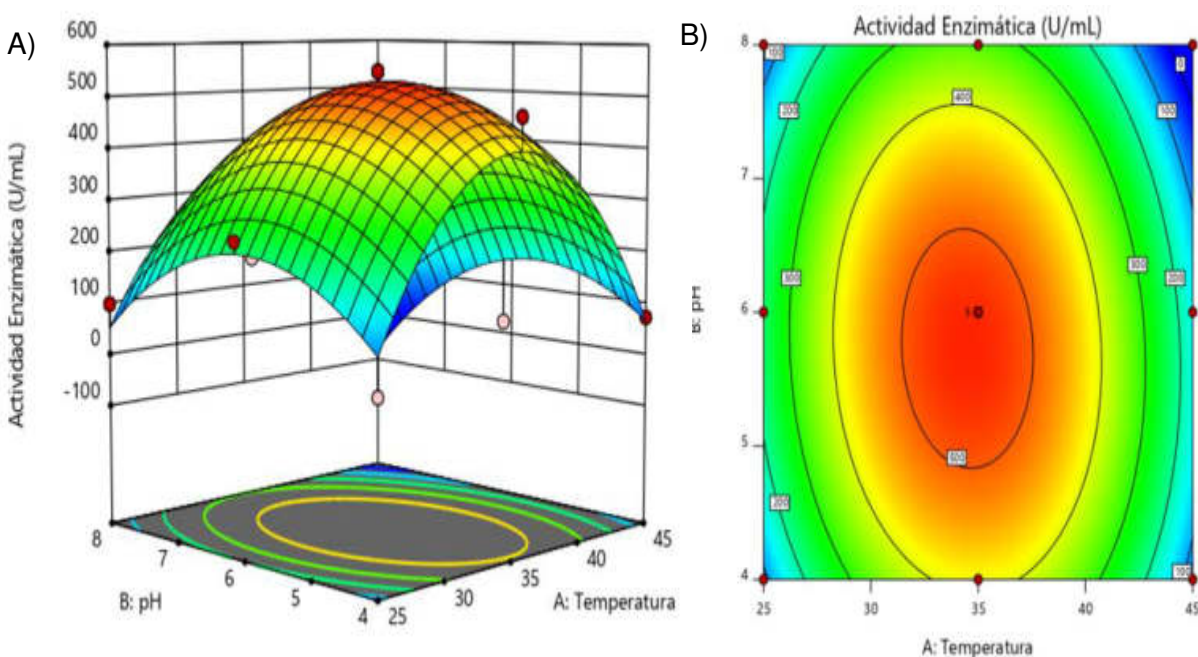
$$27.719 + -37.4408 * X_1 + -44.4252 * X_2 + -27.9118 * X_1 X_2 + -337.864 * X_1^2 + -158.62 * X_2^2$$

**ECUACIÓN 2**

El valor de  $R^2$  para todas las variables fue mayor a 0.9, lo que indica que los modelos empíricos se ajustan a los datos reales, así mismo, el valor de  $p$  es menor a 0.05 lo cual indica que el modelo es significativo. La superficie de respuesta (FIG. 11 A) y el gráfico de contorno (FIG. 11 B) muestran la interacción entre las variables independientes y el punto máximo de la producción de pectinasas, en esta evaluación se encontró que la temperatura óptima es 35°C y un pH de 6.0 de acuerdo con la deseabilidad mediante el *software* prediciendo una actividad de 529.42 U/mL, replicando a las mismas condiciones se obtuvo una actividad enzimática experimental de 548.93 U/mL, con una similitud del 96.13% entre la actividad predicha y experimental; estos resultados coinciden con los reportados en la literatura con una producción de pectinasas por *Aspergillus niger* utilizando cáscara de naranja como cosustrato a 30 °C y pH de 5.5 [21], así como en la producción pectinolítica a partir de *Penicillium sp.*, registrando una máxima producción enzimática a 35 °C y pH de 6.0 con una actividad de 98.66 U/mL [61].

**TABLA 10.** Diseño central compuesto para las variables utilizadas como respuesta la actividad enzimática para la producción óptima

CORRIDA	VALORES CODIFICADOS DE LAS VARIABLES		U/mL
	A: TEMPERATURA	B: pH	
1	1	1	16.0468
2	-1	1	72.7082
3	1	-1	98.6188
4	-1	-1	43.6333
5	1	0	249.984
6	-1	0	23.6632
7	0	1	476.092
8	0	-1	156.043
9	0	0	548.932
10	0	0	548.932
11	0	0	548.932
12	0	0	548.932
13	0	0	548.932



**FIG. 11** A) Superficie de respuesta y B) Gráfico de contorno del efecto de la temperatura y pH con respecto a la producción enzimática

## 4.7 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

Tomando las condiciones óptimas de la producción de pectinasas en fermentación sumergida se determinaron las condiciones de reacción de la actividad enzimática máxima generada por el hongo variando la temperatura y pH (TABLA 11). El diseño fue ajustado similar a lo mencionado en el apartado 5.6, obteniendo la ecuación del modelo cuadrático (ECUACIÓN 3); se obtuvo el análisis de varianza con una  $R^2$  mayor a 0.9 (TABLA 2 ANEXO), indicando que tanto la temperatura como el pH son parámetros significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto a la actividad enzimática.

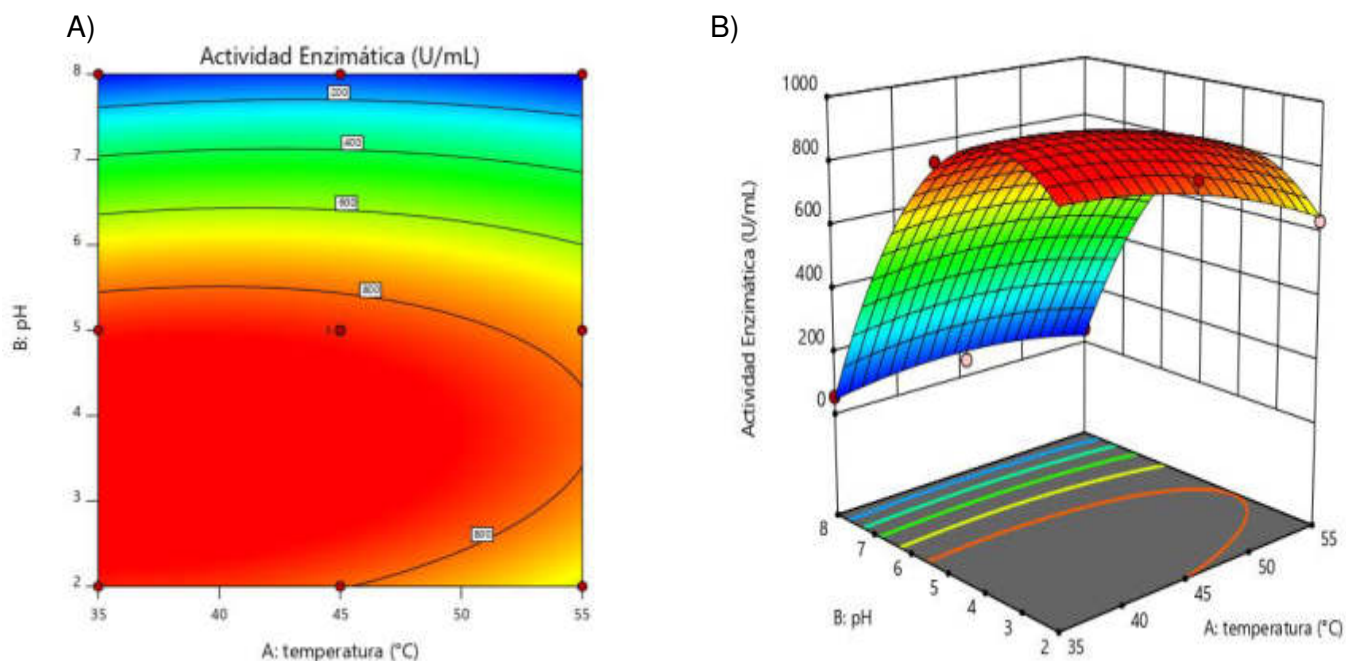
$$941.16 + -47.635 * X_1 + -57.4158 * X_2 + -31.7121 * X_1 X_2 + -547.584 * X_1^2 + -265.462 * X_2^2$$

### ECUACIÓN 3

La superficie de respuesta y el gráfico de contorno (FIG.12 A y B) muestran la interacción entre la temperatura y el pH con respecto a la actividad enzimática. Los valores determinados mediante el cálculo de deseabilidad a partir del *software*, prediciendo una actividad de 869.57 U/mL a 35°C y pH de 5.0. Se observa que la temperatura es un parámetro significativo ya que la actividad pectinolítica aumenta conforme la temperatura se incrementa, mostrando el punto máximo de actividad experimental (888.16 U/mL) a 35°C, este mismo efecto se observa en la acidificación del medio en donde el pH óptimo fue de 5.0. Los valores presentaron una similitud de 97.92% entre los valores predichos y al obtenido por el análisis experimental. Las condiciones óptimas y los altos valores de actividad enzimática nos indican una eficaz aplicación en la industria de bebidas, debido a que generalmente se utilizan temperaturas altas y pH ácidos durante el proceso de jugos y el tratamiento de clarificación [2].

**TABLA 11.** Diseño central compuesto de las variables utilizadas en la optimización de las condiciones de reacción enzimática

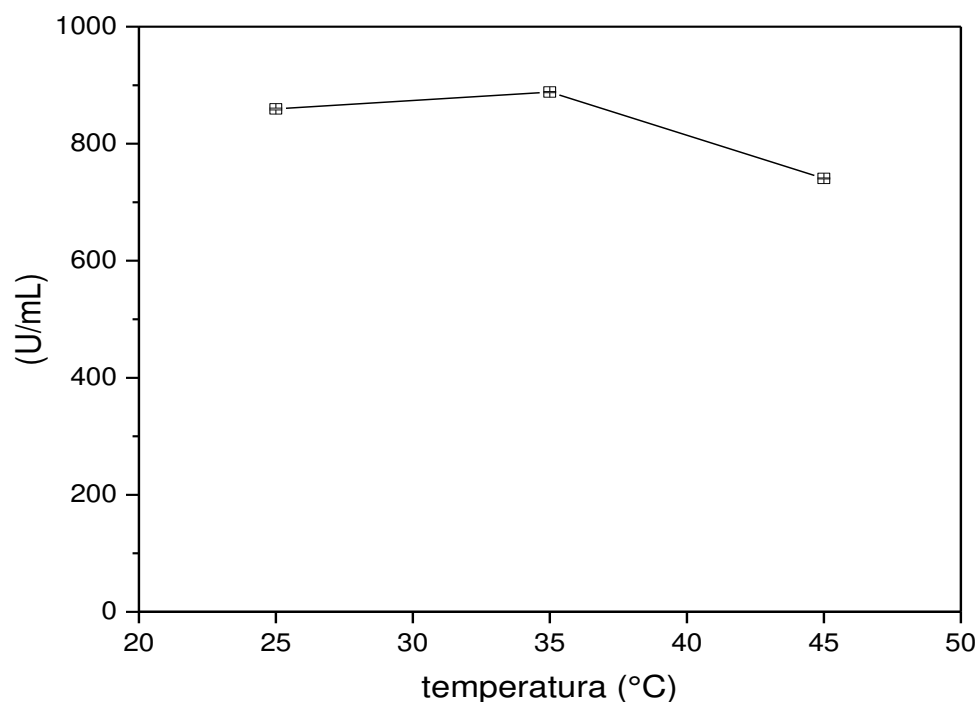
CORRIDA	VALORES CODIFICADOS DE LAS VARIABLES		U/mL
	A: TEMPERATURA	B: pH	
1	1	1	833.942
2	-1	1	635.284
3	1	-1	54.8617
4	-1	-1	45.698
5	1	0	888.186
6	-1	0	740.699
7	0	1	845.514
8	0	-1	52.842
9	0	0	859.323
10	0	0	859.323
11	0	0	859.323
12	0	0	859.323
13	0	0	859.323



**FIG. 12** A) Gráfica de contorno y B) Superficie de respuesta muestra el punto óptimo de la actividad enzimática con respecto al pH y temperatura

#### 4.7.1 EFECTO DE LA TEMPERATURA

Se ha reportado un rango de temperatura entre 25 y 40°C en donde se presenta la máxima actividad enzimática de acuerdo a la especie del hongo productor y el tipo de fermentación utilizada; en un experimento realizado con *Aspergillus niger* [3] la temperatura óptima se presentó a 30°C mediante fermentación sumergida por lote y en la producción enzimática a partir de *Penicillium sp.* CGMCC 1669 [41] una temperatura a 40°C, estos resultados coinciden con el comportamiento observado en la actividad pectinolítica por medio del hongo filamentoso (FIG.13), en donde la actividad incrementa conforme se eleva la temperatura, sin embargo, a los 45°C la actividad enzimática disminuye aproximadamente 16%, reflejando una baja estabilidad de la enzima libre a altas temperaturas.

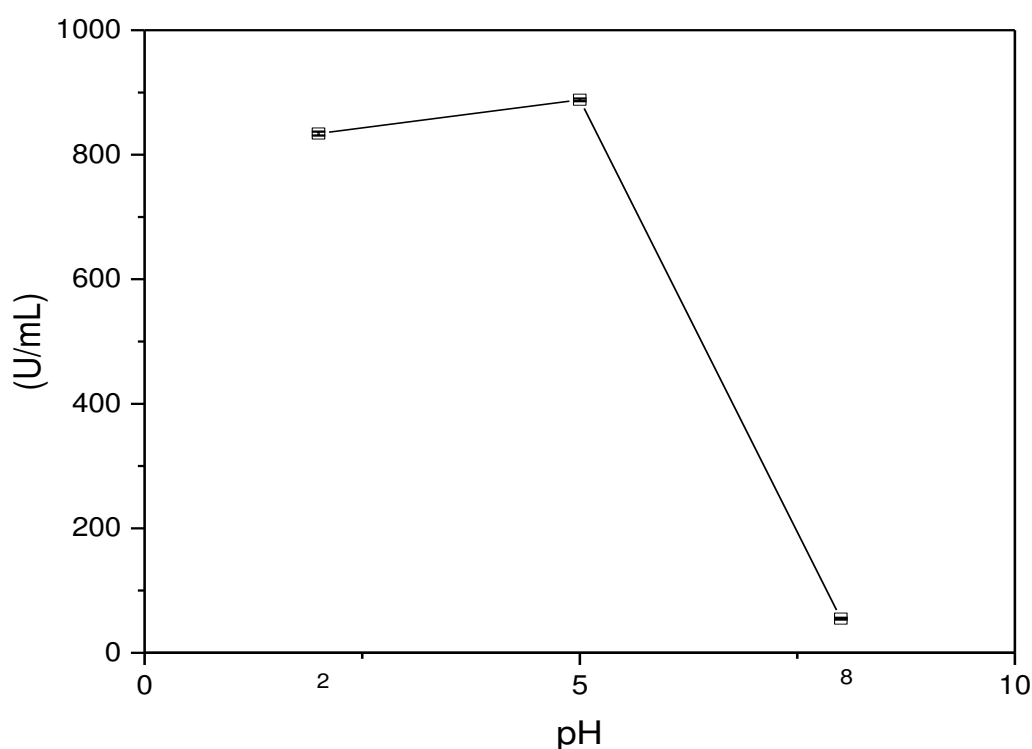


**FIG. 13** Efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto enzimático



#### 4.7.2 EFECTO DEL pH

De acuerdo con el microorganismo productor, medio de cultivo y la aplicación del metabolito de interés el pH juega un factor importante en la actividad enzimática. Las enzimas pectinolíticas generadas a partir de *Bacillus* muestran una actividad máxima en pH básicos (8.0 - 10.0), en el caso de *Aspergillus* y *Penicillium* las enzimas producidas suelen ser ácidas con un pH óptimo entre 4.0 y 6.0. Durante el tratamiento de clarificación es esencial que la enzima sea estable en medios ácidos, lo cual nos indica que las pectinasas producidas por el hongo evaluado en este proyecto podrían ser aplicadas con efectividad para la reducción de viscosidad y turbidez en jugo de manzana y naranja, ya que se observa que la actividad máxima (888.18 U/mL) se produce en pH ácidos (5.0) y decrece drásticamente 94% a pH básicos de 8.0 (FIG. 14) [2].



**FIG. 14** Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto enzimática

## 4.8 PURIFICACIÓN PARCIAL ENZIMÁTICA

Se logró purificar parcialmente la enzimas pectinolíticas producidas (*Penicillium sp.*) en fermentación sumergida. Se midió en cada etapa secuencial de la purificación la actividad enzimática y la proteína extracelular (TABLA 12). Durante el proceso de concentración se observa un incremento aproximadamente de 10% de la actividad y un rendimiento del 62.15% en la fracción menor a 50 kDa obtenida mediante ultrafiltración con membrana con respecto al extracto crudo filtrado (0.45  $\mu$ m). El incremento en el porcentaje de actividad enzimática resulta de la eliminación parcial de compuestos indeseables que pudieran competir con las enzimas de interés, permitiendo una concentración proteica. Esta concentración por ultrafiltración con membranas, permite quedarnos con la fracción <50 kDa, que coincide con los valores mencionados en la literatura, en donde las pectinasas se caracterizan por tener un peso molecular entre 30 a 50 kDa [62] [2].

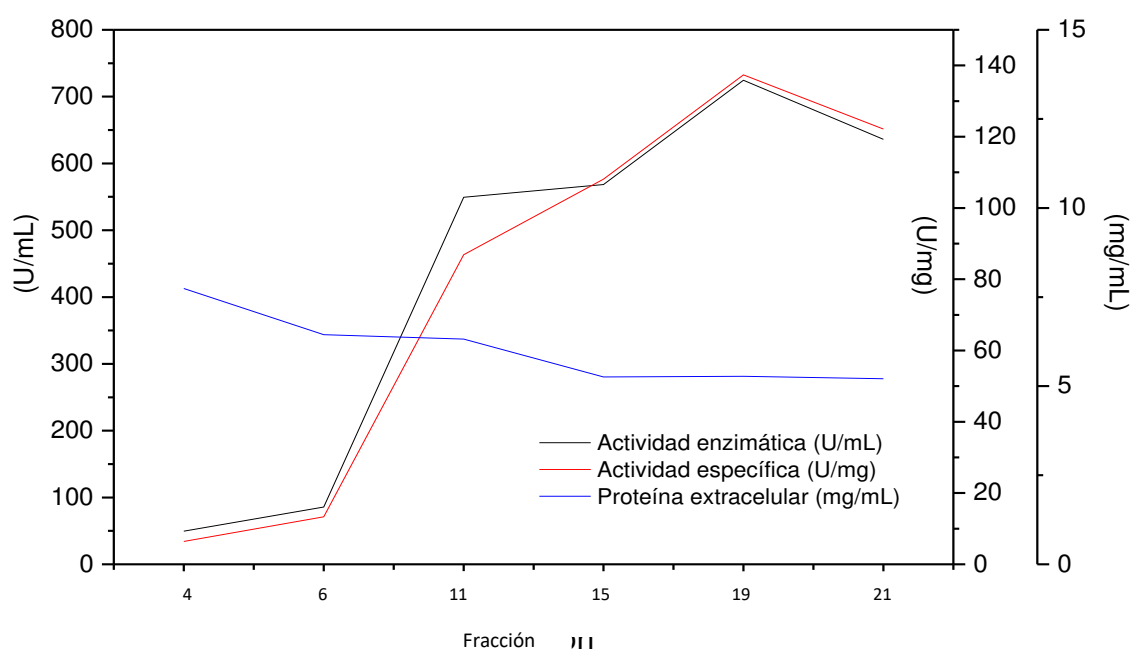
**TABLA 12.** Etapas de purificación enzimática secuencial

ETAPA	ACTIVIDAD TOTAL (U)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg)	% RENDIMIENTO	FACTOR DE PURIFICACIÓN
Filtración	39743.4	222.24	178.81	100	1
Ultrafiltración <50 kDa	43352.26	138.14	313.82	62.15	1.75
Cromatografía por exclusión por tamaño	1448.86	4.84	298.98	3.50	1.67
Ultrafiltración de fracciones (30 kDa)	1460.76	3.17	460.81	66.50	2.57

Por el contrario a los resultados esperados y reportados por diversos autores en la literatura, no se observó un incremento en la actividad enzimática posterior a la precipitación con sulfato de amonio, este efecto pudo deberse a que debido a la concentración de sales la enzima pudo desnaturalizarse, o bien, que la enzima se lixivara debido al tamaño del poro utilizado en la membrana de diálisis, perdiendo gran porcentaje de la actividad enzimática [63]. Se realizaron precipitaciones con

solventes como etanol y cloroformo, sin embargo, los resultados seguían generando actividades y recuperaciones muy bajas. Debido a esto, seleccionó la fracción concentrada por ultrafiltración (<50 kDa) para continuar el proceso de purificación con la exclusión por tamaño.

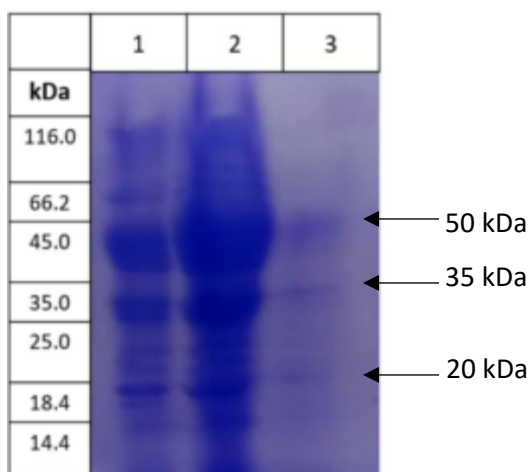
De acuerdo con los resultados por cromatografía por exclusión por tamaño (Fig. 15) se observó que la mayor actividad enzimática se obtiene de una fracción proteica de bajo peso molecular (Fracción 19) de un total de 25 fracciones, coincidiendo con lo mencionado en reportes de caracterización de pectinasas [2]. Sin embargo, el mayor incremento en la actividad enzimática se continuó presentando en la fracción concentrada mediante ultrafiltración (<50 kDa), debido a que permite un rango más amplio en el tamaño molecular del grupo de enzimas pectinolíticas [62]. Por lo tanto, debido a que en esta fracción se presentó mayor porcentaje de actividad enzimática, se decidió continuar las evaluaciones y la inmovilización con el extracto enzimático ultrafiltrado (<50 kDa).



**FIG. 15** Diagrama del comportamiento de las fracciones en Sephadex G-100 con respecto a la concentración proteica, actividad enzimática y actividad específica

#### 4.8.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR POR SDS-PAGE

Mediante el análisis de electroforesis en gel se identificó el peso molecular de las enzimas presentes en la fracción <50 kDa (FIG. 16). La muestra control proveniente de pectinasas de *A. niger* (*Sigma Aldrich*) presentó bandas entre 20 – 60 kDa, indicando la presencia de una mezcla de exo y endo enzimas, este mismo resultado se observó en la fracción ultrafiltrada (<50 kDa), identificando bandas en 20, 30 y 50 kDa. En estudios previos se revela que la masa molecular de las pectinasas varía de acuerdo con las especies microbianas y de la fracción enzimática analizada. Se determinó el peso molecular (30 kDa) de exo-pectinasa proveniente de *A. niger* purificada mediante cromatografía de intercambio iónico, así mismo, para la exo-pectinasa de *Aspergillus kawachii* se reportó una masa molecular de 65 kDa [3]. También, se reporta una masa molecular de 75 kDa para exo-PG (*P. frequentans*) purificada por filtración en gel, encontrando similitudes en valores reportados para especies como *A. tubingensis* (78 kDa) [64]. Las exo y endo poligalacturonasas producidas por *P. notatum* previamente purificadas por intercambio iónico indicaron un peso molecular de 85 y 20 kDa, respectivamente [65]. Estos valores de caracterización bioquímica reportados en literatura presentan similitudes con los observados en el análisis de este proyecto, demostrando la presencia de enzimas pectinolíticas producidas a partir del hongo aislado.



**FIG. 16** SDS-PAGE de pectinasa. (1) Marcador de peso molecular, (2) Pectinasa de *A.niger* y (3) Pectinasa a partir de ultrafiltración (<50 kDa)

## 4.9 PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ENZIMA LIBRE

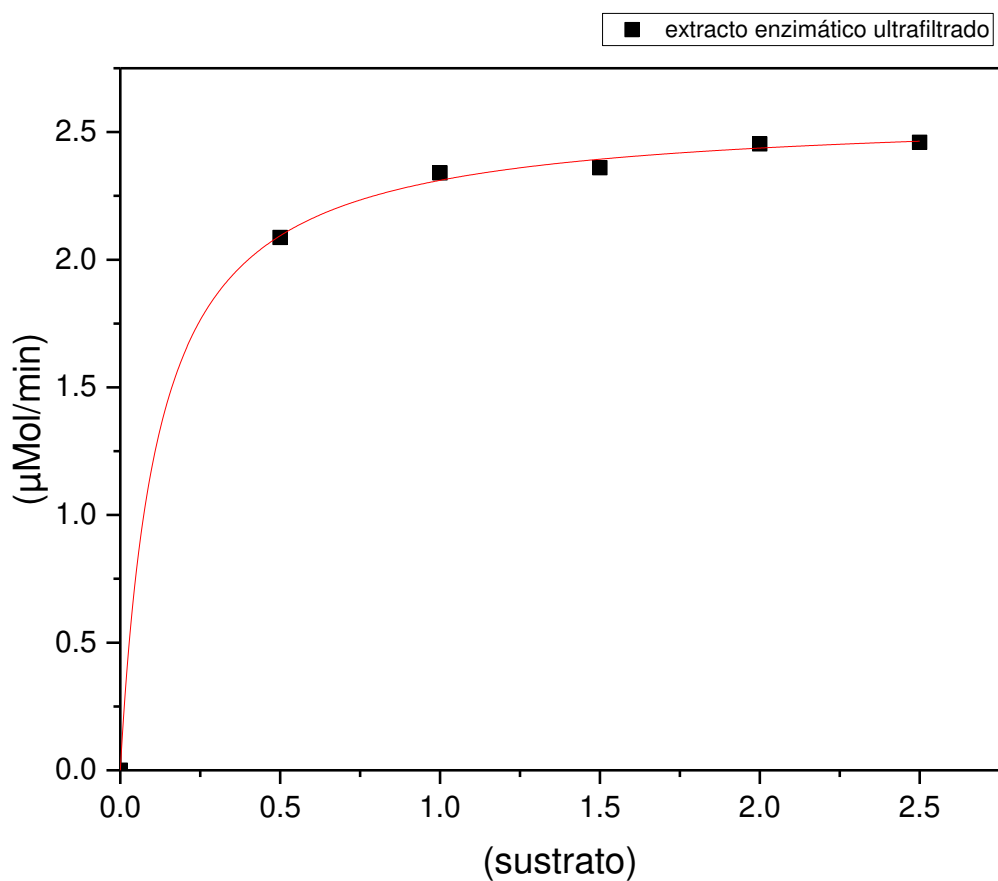
Los parámetros cinéticos para la actividad exo-PG del extracto ultrafiltrado (<50 kDa) (FIG. 17) se determinaron cuantificando la velocidad inicial de producción de ácido galacturónico a diferentes concentraciones de sustrato (0.5 - 2.5 mg/mL); la ecuación de Michaelis-Menten (ECUACIÓN 4) fue ajustada a los datos experimentales, el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ) fue de 0.999 pudiendo inferir mediante este valor que el modelo era adecuado para describir la cinética de la actividad pectinolítica.

$$\mu = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

ECUACIÓN 4

Los parámetros cinéticos determinados para la fracción enzimática semi purificada fueron  $V_{max} = 2.578 \pm 0.024 \mu\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $k_m = 0.115 \pm 0.010 \mu\text{mol/mL}$ , indicando un aumento en la afinidad comparando con los valores obtenidos del extracto enzimático crudo ( $11.06 \pm 1.23 \mu\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $0.777 \pm 0.25 \mu\text{mol/mL}$ ), resultado de una correcta exclusión de fracciones proteicas no correspondientes a enzimas pectinolíticas. Los parámetros cinéticos de los extractos enzimáticos coinciden con los determinados para pectinasas comerciales provenientes de *A. niger* (TABLA 13), así mismo, se presenta similitud con los valores reportados para *A. niger* Aa-20 [19], utilizando cáscara de limón como fuente de carbono con una  $V_{max}$  de  $3.884 \mu\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y una  $k_m$  de  $7.99 \mu\text{mol/mL}$  para pectinasas inmovilizadas en perlas de alginatos producidas por *A. aculeatus* [66].

Con el fin de detectar enzimas no pectinolíticas que pudieran interferir en la degradación de pectina, se evaluaron los parámetros cinéticos utilizando celulasas comerciales de *A. niger* en las concentraciones de sustrato en los análisis anteriores ( $V_{max} = 0.0104 \pm 0.0081$  y  $k_m = 4.194 \pm 4.68$ ), en donde se observa una afinidad enzima-sustrato menor comparando los valores de  $k_m$  obtenidos anteriormente por enzimas pectinasas, este resultado puede ser debido a que las enzimas celulasas degradan principalmente compuestos celulósicos o lignocelulósicos [67].



**FIG. 17** Gráfica de los parámetros cinéticos Michaelis-Menten del extracto enzimático ultrafiltrado

**Tabla 13.** Parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $k_m$  de enzimas determinados en sustrato péctico (0.5 - 2.5 mg/mL) por el modelo Michaelis-Menten

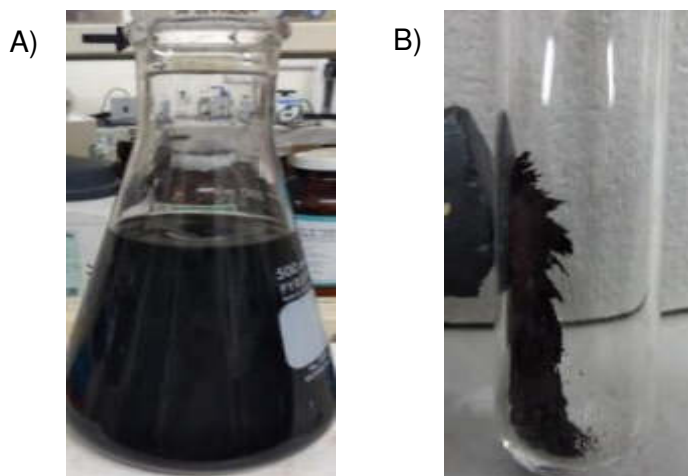
ENZIMA	$V_{max}$	$k_m$	$R^2$
Celulasas*	$0.0104 \pm 0.0081$	$4.194 \pm 4.68$	0.911
Pectinasas*	$0.00507 \pm 5.15^{-4}$	$0.627 \pm 0.206$	0.977
Extracto enzimático crudo	$11.06 \pm 1.23$	$0.777 \pm 0.25$	0.976
Extracto enzimático ultrafiltrado (<50 kDa)	$2.578 \pm 0.024$	$0.115 \pm 0.010$	0.999

\**A. niger* (Sigma Aldrich)

#### 4.10 SÍNTESIS DEL *CORE-SHELL*

Las partículas de magnetita comerciales fueron dispersadas mediante ultrasonificación y posteriormente recubiertas utilizando tetraetoxisilano como precursor para formar el *shell* de SiO<sub>2</sub>. Las nanopartículas de magnetita se recubren cuando los grupos férricos de la superficie de la nanopartícula magnética forman enlaces con los grupos silanol (Si–O–H). Posteriormente, las nanopartículas *core-shell* de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> fueron modificadas químicamente añadiendo 3-aminopropiltietoxisilano (APTES), en esta reacción química los grupos silanol del *shell* son remplazados parcialmente por grupos aminopropil, obteniendo como resultado el *core-shell* aminado Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.

Las nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> presentaron un color negro característico de la magnetita y se mantuvo la propiedad magnética (FIG. 18 A y B). Finalmente, el *core-shell* fue recuperado mediante campo magnético [68].

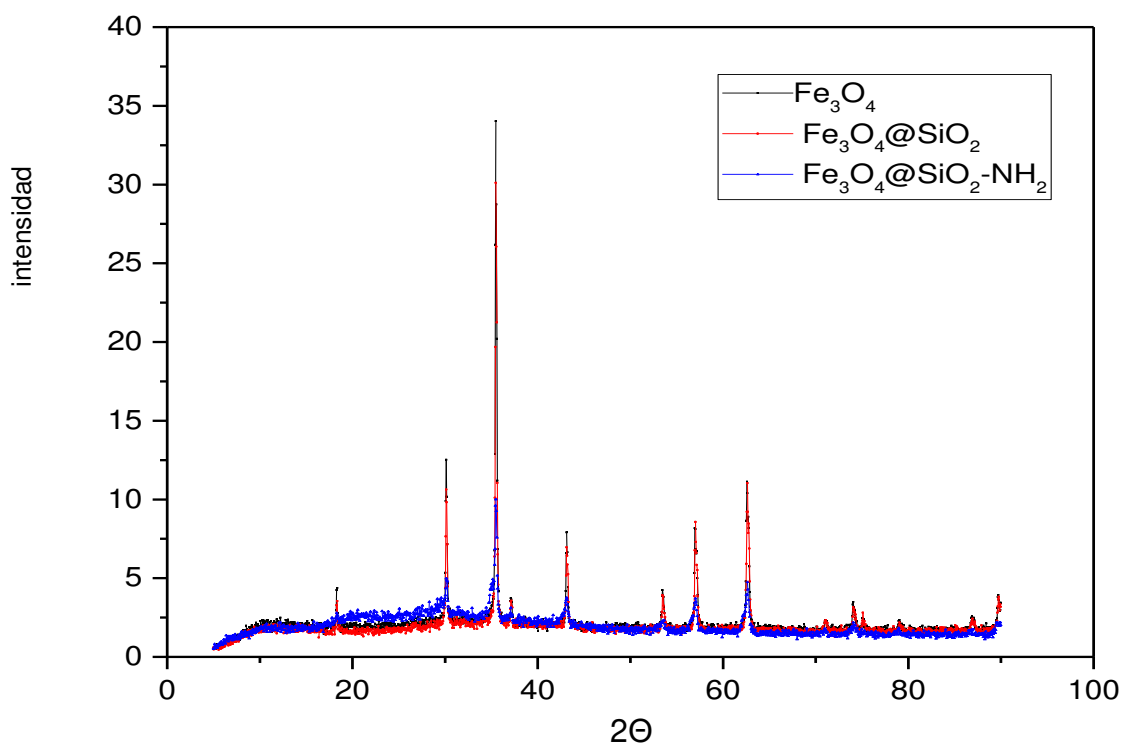


**FIG. 18** A) Dispersión de nanopartículas B) *Core-shell* recuperado mediante campo magnético

## 4.11 CARACTERIZACIÓN DEL *CORE-SHELL*

### 4.11.1 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Se observó la estructura cristalina y las fases polimórficas de la nanopartículas comerciales y del *core-shell* mediante difracción de rayos X. En el difractograma de las diferentes fases durante la síntesis del *core-shell* (FIG. 19) se observan picos a  $2\Theta$  en 30, 43, 53.8, 56.9, 62.5° los cuales coinciden con los datos estándar de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (JCPDS no. 19-0629), indicando que la magnetita no ha sufrido cambios en la estructura cristalina durante las modificaciones químicas y por lo tanto conservando las propiedades fisicoquímicas correspondientes. Así mismo, en el difractograma perteneciente a  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$  se observa un ensanchamiento en los picos indicando la unión química del silicio a la nanopartícula [69].



**FIG. 19** Difractograma del material sintetizado y funcionalizado



#### 4.11.2 POTENCIAL $\zeta$

La carga superficial fue determinada midiendo el potencial zeta ( $\zeta$ ) en las diferentes etapas de la síntesis de la nanopartícula  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  a pH de 6.60 utilizando agua ultrapura con una resistividad de  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  como dispersante (TABLA 14). El valor registrado para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  fue  $-18.0 \text{ mV}$  presentando similitud a lo reportado anteriormente en donde la magnetita presentó una señal a  $-20 \text{ mV}$  en condiciones similares de análisis (pH 6.0); un valor alto de potencial  $\zeta$  predice un sistema estable [70].

Los grupos funcionales presentes en la superficie de la nanoestructura son un factor importante en la determinación de la carga superficial y por consiguiente de las propiedades electrocinéticas de las moléculas. En la determinación del potencial  $\zeta$  de los materiales durante las diferentes etapas de síntesis se muestran los cambios del potencial  $\zeta$  en cada etapa, destacando el cambio de negativo ( $-24.6 \text{ mV}$ ) a positivo ( $13.16 \text{ mV}$ ) después de la incorporación de los grupos aminos con el APTES [48].

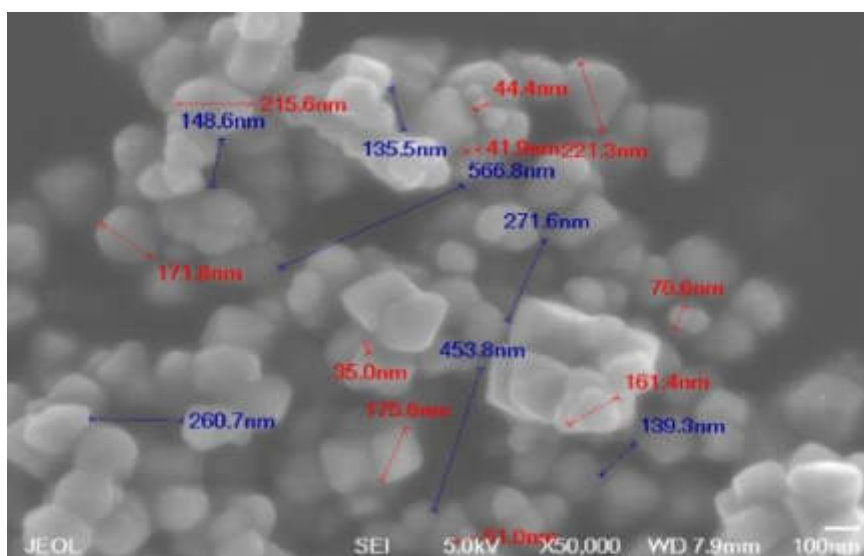
**TABLA 14.** Caracterización del material sintetizado mediante potencial  $\zeta$

MATERIAL	(mV) EXPERIMENTAL
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$-18.0 \pm 4.53$
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$	$-24.6 \pm 8.95$
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$	$13.26 \pm 2.19$

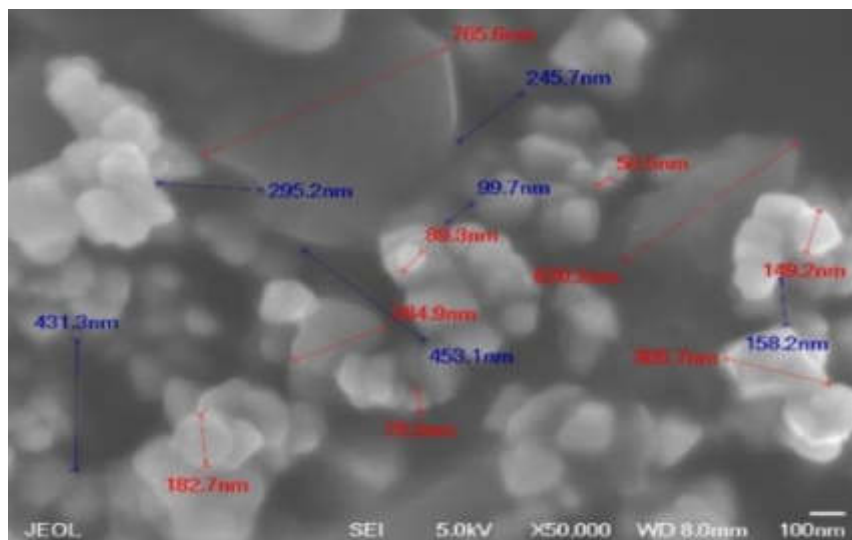
### 4.11.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se observaron las características morfológicas de la nanopartículas en las diferentes fases de síntesis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); en donde, se muestra una estructura esférica y con un tamaño homogéneo mayor a la escala 100 nm para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (FIG. 20 A). La formación del *core-shell* fue comprobada por el incremento en el tamaño de las nanopartículas magnéticas de aproximadamente 30 nm posterior a recubrir con  $\text{SiO}_2$  (FIG. 20 B). Así mismo, se observa que al modificar químicamente el *core-shell*, el tamaño de las estructuras observadas aproximadamente incrementó dos veces más debido a la unión de grupos amino a la superficie de la nanoestructura (FIG. 20 C). El tamaño observado del *core-shell* sintetizado coincide con los valores reportados en la literatura en donde  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presenta un rango entre 10 a 15 nm de diámetro. Es necesario aumentar el tiempo de ultra sonicación durante la dispersión de las nanopartículas para reducir el tamaño durante la síntesis; sin embargo, las características determinadas del *core-shell* aminado son ideales para el uso de la inmovilización enzimática [68] [71].

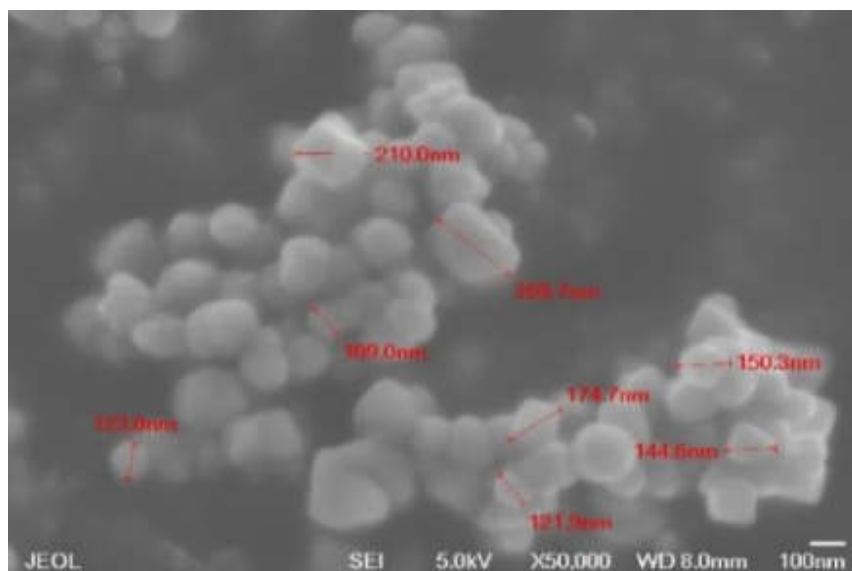
A)



B)



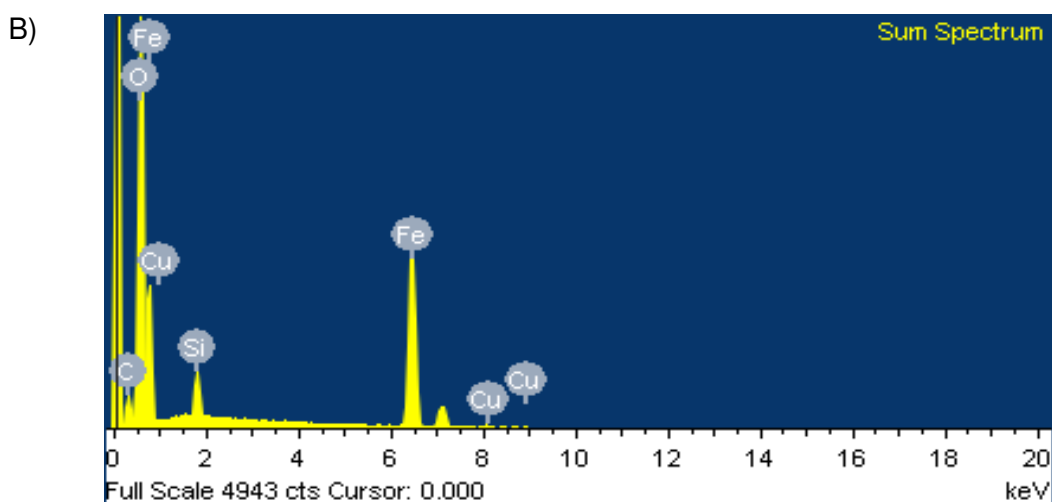
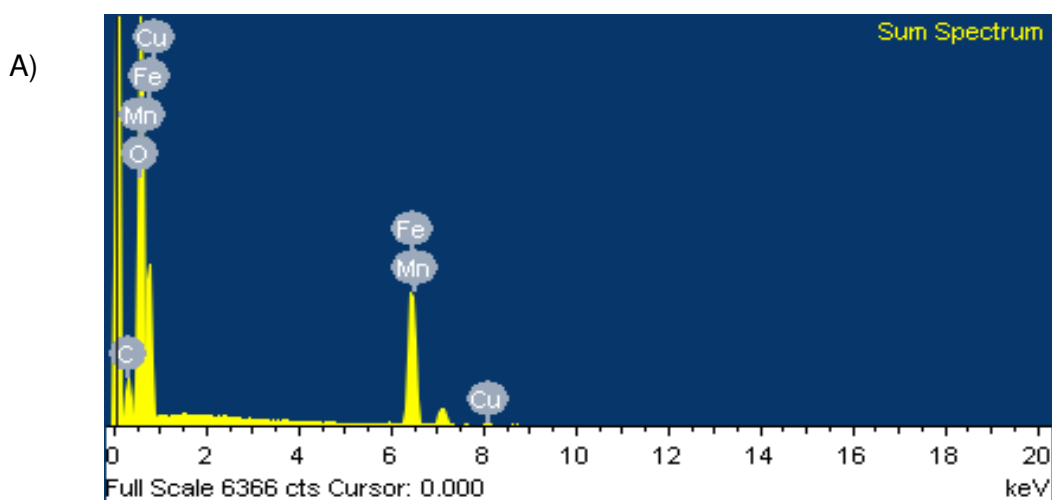
C)

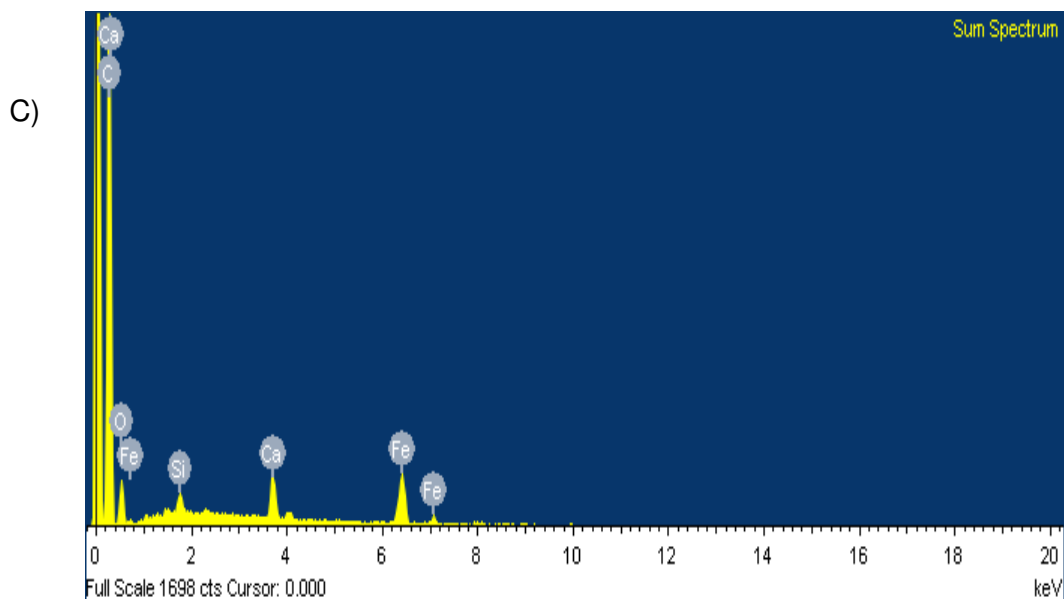


**FIG. 20** Imágenes SEM A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ , C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

#### 4.11.4 ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA

Por medio de espectroscopía de energía dispersiva (EDS) se identificó la composición elemental superficial de las nanopartículas en donde, el análisis para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (FIG. 21 A) muestra una señal en 6.4 eV el cual corresponde a Fe. Se detectan elementos como Mn y Cu, los cuales pueden provenir del porta muestras utilizado durante el análisis [72]. Se detectó una señal alrededor de 1.9-2.0 eV, indicando la presencia de Si en la síntesis del *core-shell* (FIG. 21 B). Por otro lado, se observa un aumento en la señal del elemento carbono mediante EDS (FIG. 21 C), proveniente de la conformación química del 3-aminopropiltrietoxisilano resultado de una correcta formación del soporte en las nanopartículas magnéticas [73].



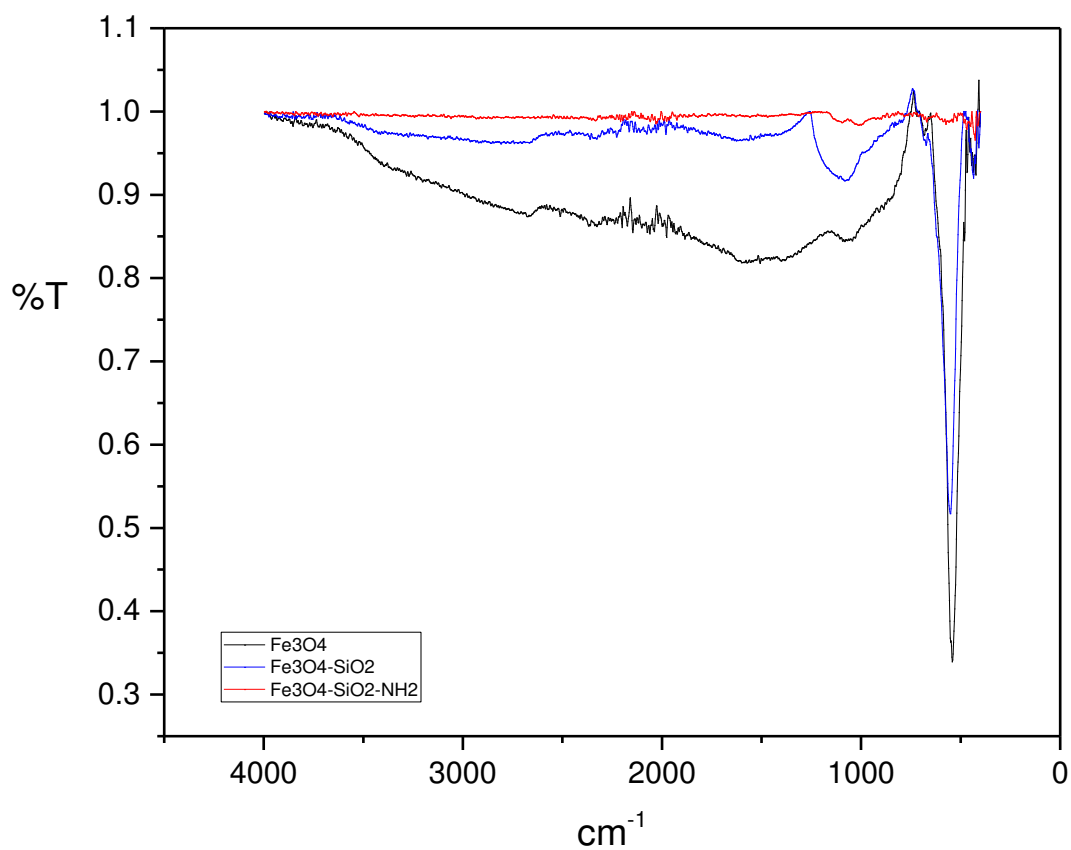


**FIG. 21** Espectroscopía de energía dispersiva (EDS) A)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , B)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ , C)  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$

#### 4.11.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON ATR

Comparando los espectros FTIR-ATR de las nanopartículas de magnetita recubiertas y no recubiertas (FIG. 22) se observa que se presenta una banda de vibración aproximadamente en  $546\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la unión de Fe-O indicando la presencia de la nanopartícula  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y la conservación de las propiedades físicas durante las diferentes fases de síntesis. Así mismo, se observan bandas de vibración pertenecientes al enlace de Si-O ( $435, 955, 1006\text{ cm}^{-1}$ ), corroborando la formación de la recubierta (*shell*) en la nanopartícula magnética. Conservando las bandas anteriores se observó pequeñas vibraciones entre  $1043$  y  $1046\text{ cm}^{-1}$  correspondientes la presencia de  $\text{NH}_2$ . Sin embargo, en los patrones obtenidos mediante el espectro se observa vibraciones de ruido, las cuales pueden deberse a la presencia de agua en las muestras analizadas [74]. Por esta técnica no fue posible identificar las bandas de la amina, sin embargo, el potencial  $\zeta$  analizado evidencia el cambio de negativo a positivo después de la incorporación del APTES, que se puede deber a la protonación de los grupos amino. Sin embargo, como el *core-shell*  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  es un cuerpo negro en IR este material evita

absorbe energía y evita poder ver bandas con intensidad bajas, como es el caso de la amina.



**FIG. 22** Espectros FT-IR de las nanopartículas de magnetita recubiertas, no recubiertas y aaminadas

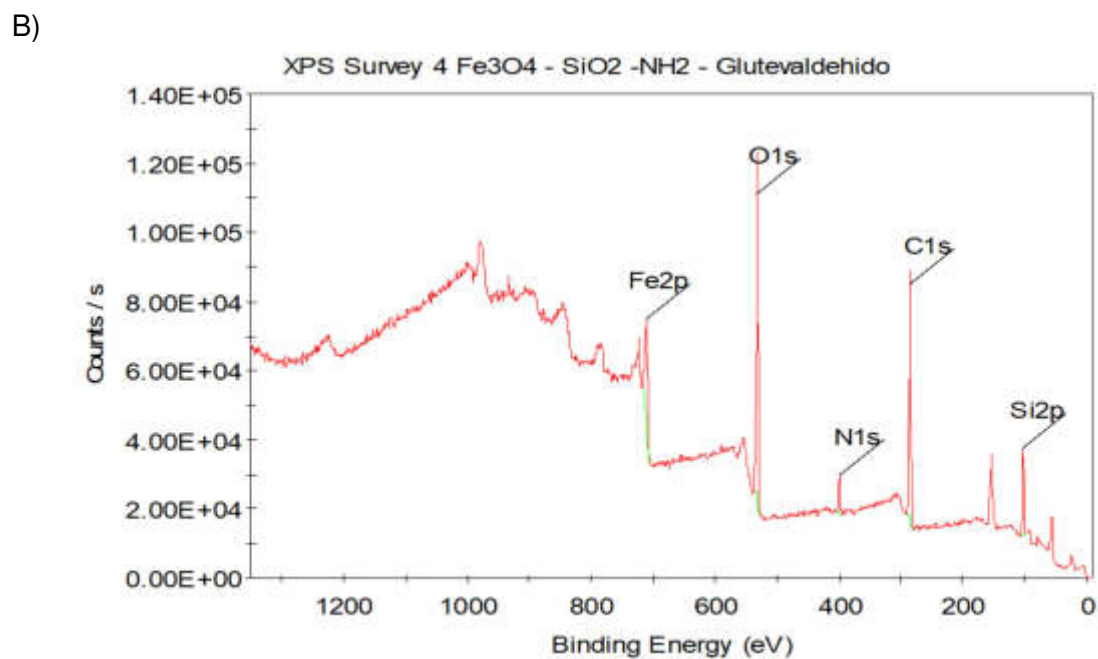
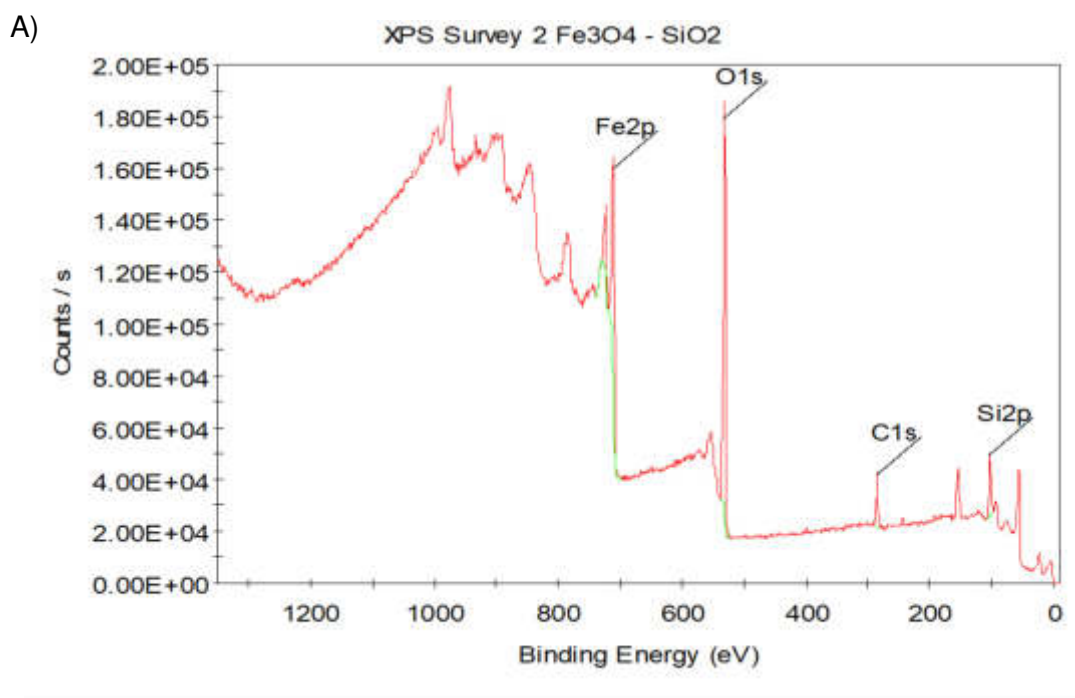
#### 4.11.6 ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X

Se determinó el contenido atómico de la superficie de las partículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-glutaraldehído}$  (TABLA 15) por XPS, en donde se observó un porcentaje de 19.89 para  $\text{Fe}_{2p}$  correspondiente al  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , valor reducido aproximadamente 50% en el análisis de la muestra  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ , resultado de la cobertura de sílice en la superficie de la nanopartícula presentando un contenido atómico del 19.41% para  $\text{Si}_{2p}$ . Se evaluó el contenido atómico de  $\text{N}_{1s}$  (5.19%) en  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$  confirmando la funcionalización de la superficie mediante el grupo amino, así mismo se observó un aumento en el contenido de  $\text{C}_{1s}$  de 12.93 a 56.57% en comparación de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ , proveniente de la cadena hidrocarbonada del APTES. El uso de glutaraldehído para la formación del enlace covalente no altera la composición química de la cubierta en la nanopartícula funcionalizada ya que se observó un contenido atómico similar en  $\text{N}_{1s}$  (5.3%), pero si aumenta el contenido de  $\text{C}_{1s}$  proveniente del glutaraldehído. El contenido atómico determinado en el material sintetizado coincide con lo reportado en la literatura para  $\text{Fe}_{2p}$  (20.41%),  $\text{Si}_{2p}$  (18.71%) y  $\text{N}_{1s}$  (3.23%) [48].

**TABLA 15.** Contenido atómico superficial (%) en nanopartículas determinado por XPS

NANOPARTÍCULAS	$\text{Fe}_{2p}$	$\text{Si}_{2p}$	$\text{N}_{1s}$	$\text{C}_{1s}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	19.89	0	0	16.47
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$	9.66	19.41	0	12.93
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$	1.8	14.31	5.19	56.57
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-glutaraldehído}$	2.9	17.09	5.3	44.53

Así mismo, se obtuvieron los espectros XPS para las nanopartículas, observando picos característicos de energía de enlace para  $\text{Fe}_{2p}$ ,  $\text{O}_{1s}$ ,  $\text{C}_{1s}$  y  $\text{Si}_{2p}$  a 533, 285, 104 y 743 eV, respectivamente en la muestra de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$  (FIG. 23 A), en contraste con  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-NH}_2\text{-glutaraldehído}$  identificando una señal a 400 eV correspondiente a  $\text{N}_{1s}$ , evidenciando la unión del grupo amino a la superficie del *core-shell* (FIG. 23 B) [50].



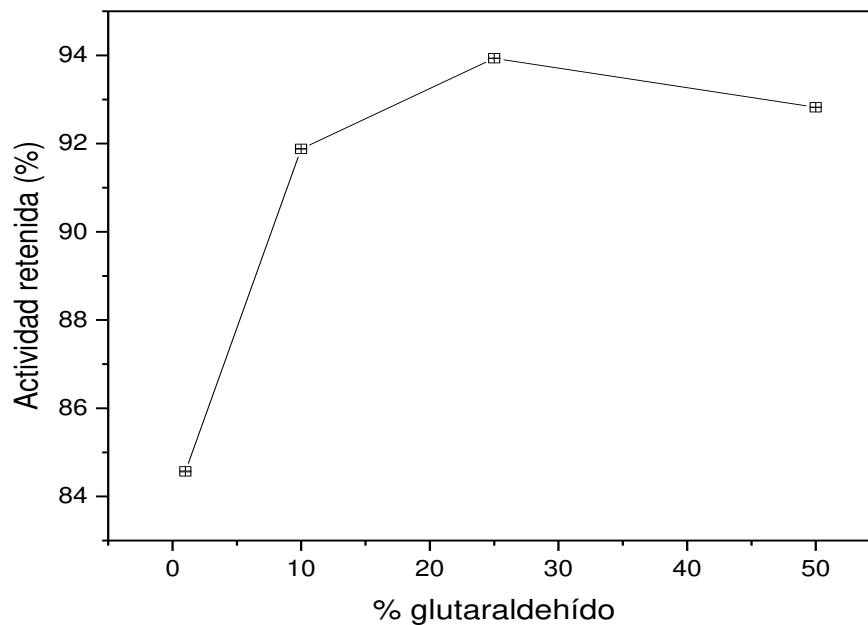
**FIG. 23.** XPS de las nanopartículas A) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> y B) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>- glutaraldehído



## **4.12 INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA**

### **4.12.1 CONCENTRACIÓN DE GLUTARALDEHÍDO COMO ENLACE COVALENTE**

El uso de glutaraldehído como agente de enlace covalente interacciona mediante grupos funcionales entre la enzima y las nanopartículas magnéticas aminadas. Como se menciona en literatura el agente de unión tanto covalente como de entrecruzamiento cumple un papel importante en la estabilidad de inmovilización enzimática. Se observa que a baja concentración de glutaraldehído la actividad retenida es menor debido a una inadecuada unión de la enzima-soporte (FIG. 24), el máximo porcentaje de actividad retenida (93 %) se obtuvo a una concentración de agente de enlace al 25% (v/v), sin embargo, al continuar incrementando la concentración de glutaraldehído la actividad enzimática retenida comienza a disminuir; similarmente, este efecto se presenta al utilizar poli aldehído-dextrano como agente de entrecruzamiento en la inmovilización de pectinasas en nanopartículas magnéticas de quitosano, con una actividad máxima recuperada al 2.5% (v / v), disminuyendo al aumento adicional en la concentración del reticulante, los autores mencionan que esto fue debido a una rigidez mayor de las enzimas debido al entrecruzamiento y por lo tanto, una pérdida consecutiva de actividad [31]. Así mismo, una concentración en exceso del agente de unión puede provocar precipitación y modificación en la estructura de la enzima generando una pérdida de la actividad enzimática [25]. En este estudio se utilizó una concentración de 25% v/v de glutaraldehído para la formación de enlace covalente en la inmovilización de pectinasas.



**FIG. 24** Actividad enzimática retenida en la inmovilización de pectinasas en diferentes concentraciones de glutaraldehído

#### **4.12.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RETENIDA Y CAPACIDAD DE ADSORCIÓN SOBRE EL MATERIAL DE SOPORTE DURANTE LA INMOVILIZACIÓN**

Se evaluó la actividad enzimática retenida con respecto a la cantidad de enzima inicial (0.1-1.0 % v/v) (TABLA 16). Se observó un incremento en la actividad enzimática (U) con respecto al aumento de la concentración de pectinasa inicial, alcanzando la máxima actividad retenida (183.62 U) a una concentración enzimática de 1.0 % v/v; reteniendo el 80% de la actividad inicial. Porcentajes similares se ha reportado en trabajos anteriores durante la inmovilización de pectinasas en nanopartículas magnéticas aminadas en donde el porcentaje máximo de enzima inmovilizada fue alrededor del 98% con una carga inicial de 250 µg de pectinasa en 5.0 mg de material sintetizado [49]. Así mismo, se presenta similitud con los resultados obtenidos durante la inmovilización de pectinasas de *Penicillium*

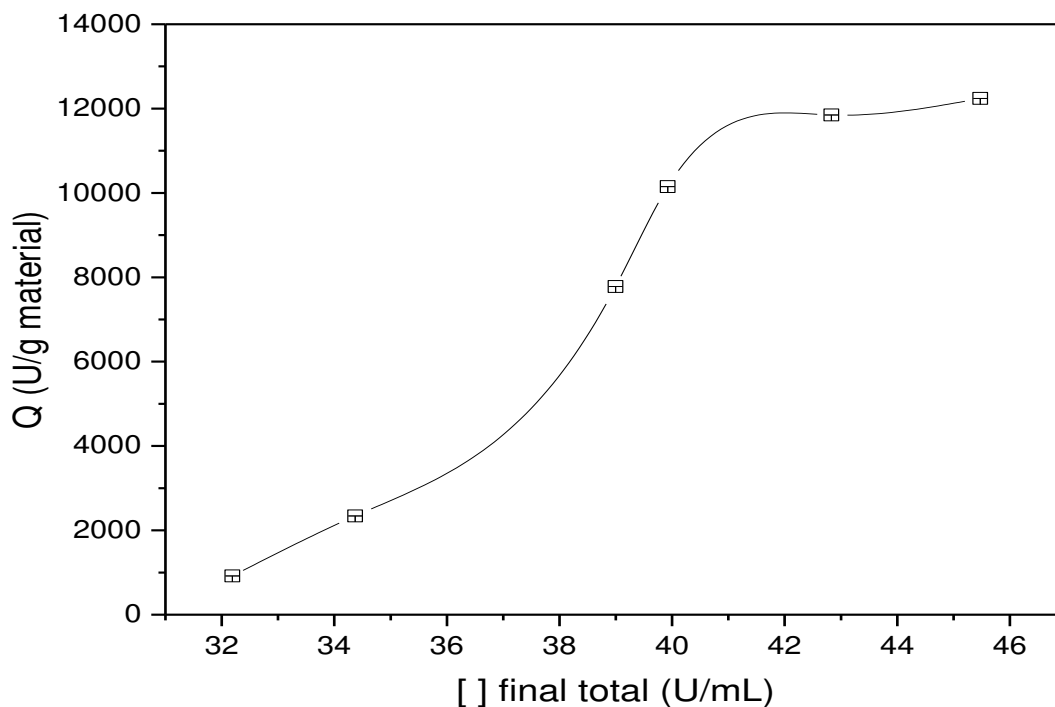
*oxalicum* F67 en microesferas magnéticas *cornstarch* en donde la tasa de recuperación de actividad máxima (86.7%) se obtuvo con una concentración enzimática de 0.2 - 0.3%, sin embargo, disminuyó cuando la concentración de enzima llegó al 0.5% [25]. Esto indica que tanto la cantidad como la composición del material son factores que afectan la inmovilización enzimática, ya que la sobre concentración de enzima impide la unión de las moléculas hacia el soporte, reduciendo la afinidad de unión.

**TABLA 16.** Efecto de la concentración inicial de pectinasas sobre la actividad retenida durante la inmovilización y la capacidad de adsorción sobre el material de soporte

ENZIMA	ACTIVIDAD INICIAL	Δ FINAL TOTAL	ACTIVIDAD RETENIDA	Q
μL	U/mL	U/mL	U	U/g de material
50	45.99	32.18	13.80	920.04
100	69.49	34.37	35.12	2341.71
200	155.68	38.99	116.68	7779.24
300	192.13	39.92	152.21	10147.67
400	220.58	42.83	177.75	11850.18
500	229.10	45.47	183.62	12241.71

Se evaluó la capacidad máxima de adsorción química de la enzima sobre la nanopartícula  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-glutaraldehído}$ . Se obtuvo una gráfica de la cantidad de pectinasa inmovilizada por gramo de material vs la concentración enzimática final en una solución (sin adsorberse) (FIG. 25), indicando que a partir de la concentración enzimática inicial de 0.8 % v/v el material de soporte comienza a saturarse, reflejando una estabilidad gradual en la cantidad de enzima inmovilizada, en donde el punto máximo de retención fue 12241.71 U/g de material (1.0 % v/v). Resultado similar se presenta durante la inmovilización de lacasas en esferas magnéticas de sílice, la cantidad inmovilizada de lacasa aumenta con la concentración de enzima, hasta una concentración en la que no se puede inmovilizar más biocatalizador, lo que puede estar relacionado con el área superficial de las nanopartículas magnéticas recubiertas [47]. Se fijó una

concentración inicial enzimática de 1.0 % v/v en la inmovilización de pectinasas para la clarificación de jugos durante este proyecto.



**FIG. 25** Pectinasa inmovilizada en soporte en función de la concentración enzimática final

#### 4.13 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

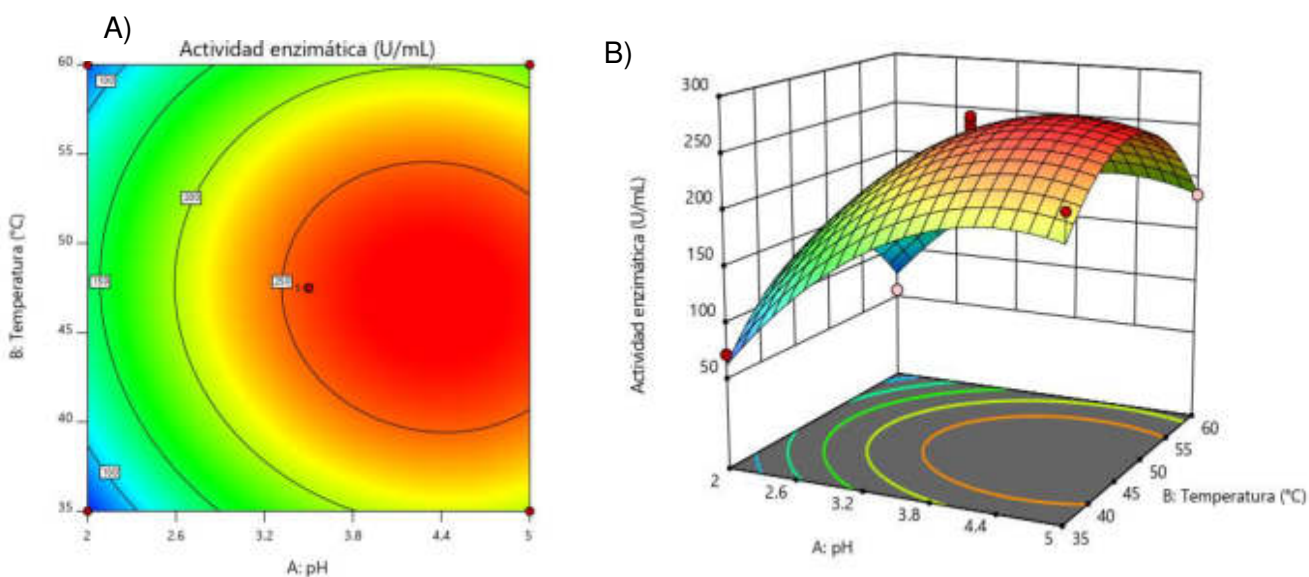
Se evaluó el efecto del pH y la temperatura para determinar los valores óptimos de las condiciones de reacción de la actividad enzimática inmovilizada (TABLA 17). Los resultados (FIG. 26 A y B) indicaron mayor actividad a pH ácidos (4.5 - 5.0) y temperaturas altas (45 - 50°C) comparados con los parámetros óptimos para la pectinasa libre. Aplicando la función de deseabilidad mediante el software *Desing Expert*, los valores óptimos predichos fueron pH 4.5 y 50 °C con una similitud del 97.78% a los datos experimentales obtenidos.

En un estudio previo de pectinasas inmovilizadas en nanopartículas magnéticas se reporta una actividad máxima de la enzima inmovilizada a pH 4.0, una unidad menos al valor óptimo para la enzima libre [75], coincidiendo con lo encontrado en este proyecto. Así mismo, en pectinasas inmovilizadas en perlas de alginato, se muestra una mayor actividad en pH ácidos (3.0) en comparación a la enzima soluble (pH 5.0) [8]. El cambio en el valor óptimo y la estabilidad del pH puede depender del cambio de cargas de la enzima posterior a la inmovilización, así como a las características fisicoquímicas del soporte. Por otro lado, el tipo de enlace covalente evita que la enzima se suelte por cambios conformacionales o de cargas tanto del material como de la enzima.

La temperatura óptima para la pectinasa inmovilizada fue 50°C, 15°C más que la enzima libre analizada anteriormente, estos resultados indican que la enzima gana estabilidad a temperaturas altas. Estos resultados coinciden con la estabilidad reportada en literatura utilizando como soporte microesferas magnéticas, en donde el autor menciona que la inmovilización confiere protección a la pectinasa (*Penicillium oxalicum* F67) en su estado plegado en temperaturas altas [32]. La extensión en el rango térmico se relaciona con el tipo material utilizado como soporte. Se ha demostrado la estabilidad de las nanopartículas magnéticas durante la inmovilización, en comparación con los resultados reportados utilizando perlas de alginatos, que han mostrado inestabilidad de la pectinasa a temperaturas mayores a 50°C atribuyendo lo obtenido a la baja protección del material contra la desnaturalización de la enzima a temperaturas más altas [8].

**TABLA 17.** Diseño central compuesto de las variables utilizadas en la optimización de la actividad inmovilizada

CORRIDA	VALORES CODIFICADOS DE LAS VARIABLES		U/mL
	A: pH	B: TEMPERATURA	
1	-1	-1	71.541
2	1	-1	229.101
3	-1	1	56.2107
4	1	1	183.962
5	0	1	66.7605
6	0	1	221.497
7	-1	0	91.9812
8	-1	0	124.974
9	0	0	267.744
10	0	0	261.621
11	0	0	270.593
12	0	0	246.243
13	0	0	245.742



**FIG. 26** A) Gráfica de contorno y B) superficie de respuesta muestra el punto óptimo de la actividad enzimática inmovilizada con respecto al pH y temperatura

#### 4.14 PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Se determinaron los parámetros cinéticos de la pectinasa parcialmente purificada inmovilizada en nanopartículas *core-shell* a partir del modelo de Michaelis-Menten tal como lo descrito en la sección 3.9. Los resultados obtenidos muestran el efecto de la inmovilización hacia el sitio activo de la enzima (Tabla 18); no se observó diferencia entre los valores de  $V_{max}$  de la pectinasa libre e inmovilizada, lo que indica que la actividad hidrolítica hacia el sustrato péctico no se ve afectada por la inmovilización, esto debido al enlace covalente utilizado para la unión enzima-*core-shell* [49]. Sin embargo, el valor de  $k_m$  para la enzima inmovilizada fue mayor que el determinado en la pectinasa libre, lo cual señala que la afinidad enzima sustrato se ve afectada por la inmovilización, probablemente debido a un impedimento en los sitios activos de la pectinasa. Este mismo efecto se reporta en un estudio de caracterización de pectinasas libres e inmovilizadas en nanopartículas con quitosano por reticulación, en donde la disminución de la afinidad de la enzima inmovilizada se atribuyó a la retención de la flexibilidad conformacional después de la inmovilización pectinolítica [31].

**TABLA 18.** Parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $k_m$  de enzima libre e inmovilizada en sustrato péctico (0.5 - 2.5 mg/mL) por el modelo Michaelis-Menten

ENZIMA	$V_{max}$	$k_m$	$R^2$
Extracto enzimático (<50 kDa) inmovilizado en <i>core-shell</i>	$2.6217 \pm 0.127$	$0.9777 \pm 0.0602$	0.9955
Extracto enzimático ultrafiltrado (<50 kDa)	$2.578 \pm 0.024$	$0.115 \pm 0.010$	0.999

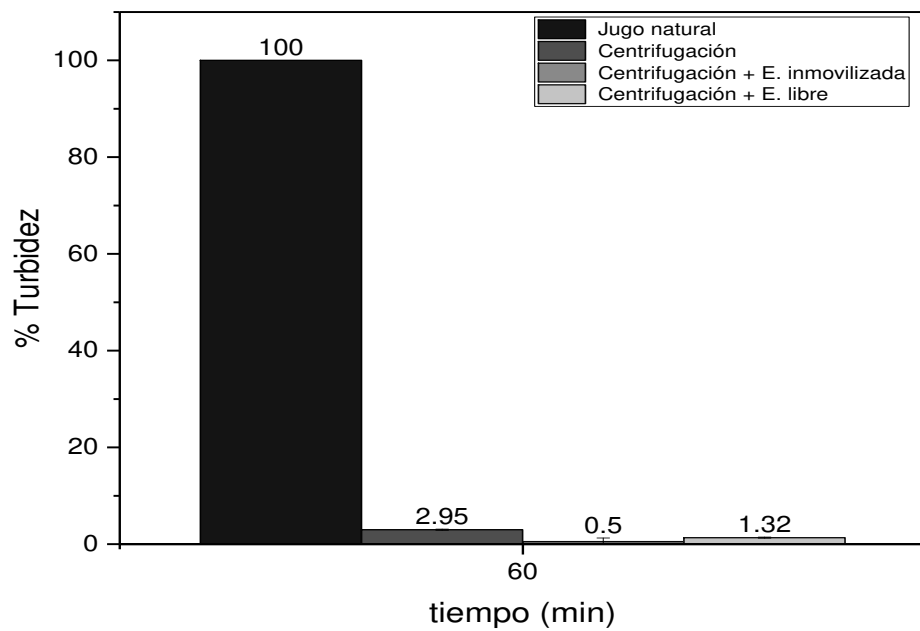
## 4.15 CLARIFICACIÓN DE JUGOS

### 4.15.1 REDUCCIÓN DE TURBIDEZ EN JUGO DE MANZANA Y NARANJA

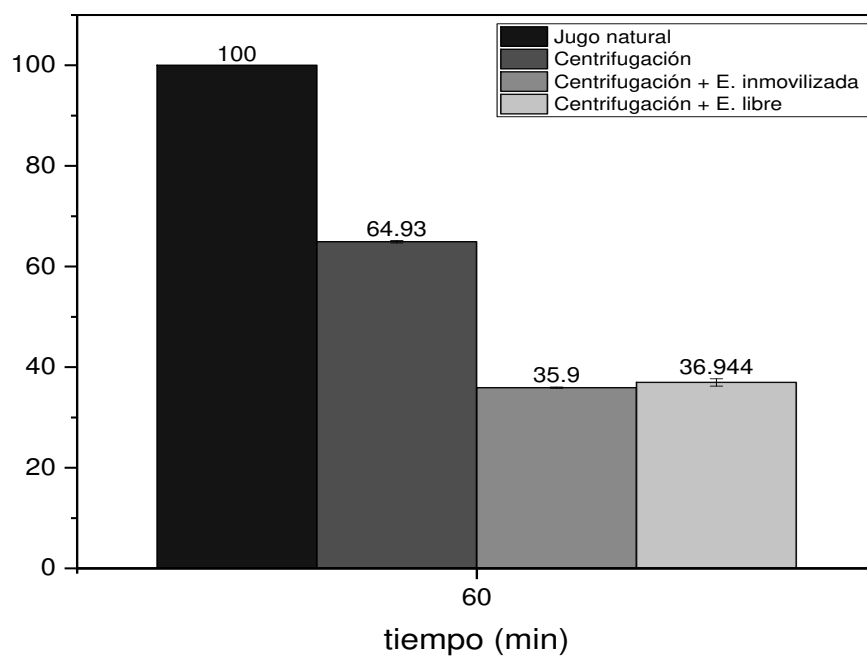
La capacidad de la actividad pectinolítica en la clarificación de jugo de naranja (pH 3.5) y manzana (pH 3.9) fue evaluada mediante la reducción de la turbidez determinada por el porcentaje de transmitancia (660% T), posterior a la centrifugación de los jugos. Durante el proceso de clarificación en jugo de manzana (FIG. 27 A) no se presentó diferencia significativa en el uso de tratamiento enzimático y el control llevado a cabo por métodos mecánicos, debido a que durante la centrifugación y filtración del jugo se separó en mayor proporción la pulpa y por lo tanto gran parte de la pectina presente en el extracto de manzana, obteniendo un sobrenadante más ligero y claro, este resultado puede deberse a la composición fisicoquímica de la fruta lo que permitió una fácil eliminación de los solutos presentes [76]. Los resultados más significativos se encontraron en el jugo de naranja (FIG. 27 B) en donde durante la primera hora de tratamiento tanto la enzima libre e inmovilizada redujeron porcentajes similares de turbidez (27.98 y 29.03% respectivamente) con respecto al control tratado mediante métodos mecánicos. Se registró una disminución en la turbidez presente en jugo de arándano de 40% a partir de exo-PG producidas por *A. niger* T0005007-2 (75 U/mL inicial), así mismo se reportó una reducción de turbidez de 30% mediante enzima comercial *Pectinex*® *Be Colour* después de 60 min de tratamiento [38]. En reportes previos se muestra la degradación de pectina en jugo de manzana mediante pectinasas inmovilizadas en nanopartículas magnéticas con quitosano, observando un efecto similar al obtenido en este estudio, al inicio del tratamiento enzimático se encuentra una tasa de reducción de turbidez por la pectinasa libre de 8%, mientras que la pectinasa inmovilizada un 6% después de 30 min, sin embargo, después de 150 min de tratamiento, la pectinasa libre redujo la turbidez del jugo hasta un 70%, mientras que, la enzima inmovilizada 74% [31] [51] .



A)



B)

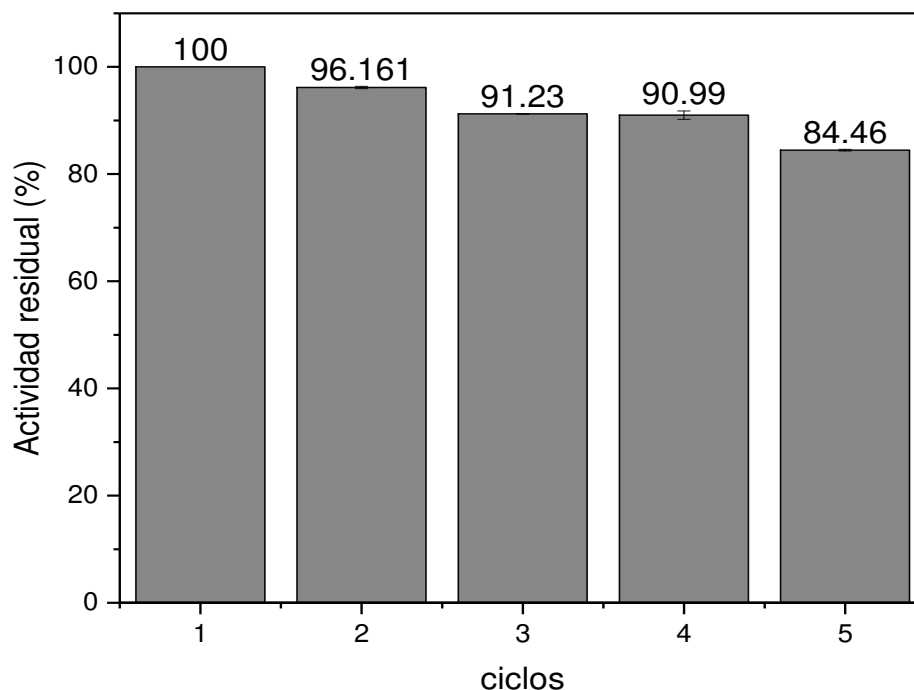


**FIG. 27** Reducción de turbidez (%) mediante enzima libre e inmovilizada en jugo de A) manzana y B) naranja

#### **4.15.2 REUSABILIDAD DE LA PECTINASA INMOVILIZADA EN CORE-SHELL**

Se evaluó la reusabilidad de la enzima inmovilizada en jugo de naranja durante 5 ciclos de uso en reacciones batch (FIG. 28), considerando la actividad de inicio como el 100%, en este estudio la pectinasa inmovilizada mantiene la actividad relativa aproximadamente 84.46 %, reflejada en la reducción de turbidez posterior al tratamiento de clarificación en jugo de naranja. El decremento de la actividad después de los 5 ciclos de uso en este trabajo fue del 15.54 % para el jugo de naranja.

En la literatura se reporta que la evaluación de la estabilidad operacional de exo-PG inmovilizadas en perlas de alginato y se observó un decremento del 28% en la actividad catalítica después del 3er ciclo, los autores mencionan que este resultado puede ser debido al lavado excesivo del material de soporte provocando una filtración y pérdida de la enzima, así como a cambios conformacionales durante la reutilización [63]. De igual manera en estudios realizados previamente se ha reportado una actividad residual de aproximadamente 85% en pectinasas inmovilizadas en nanopartículas magnéticas posterior a siete ciclos consecutivos de uso, la diferencia entre los valores reportados están relacionados con el daño mecánico hacia el material utilizado como soporte, el uso de campo magnético para la manipulación, separación y recuperación de la enzima-soporte produce menor daño a las nanopartículas permitiendo el uso continuo y otorgando un efecto protector a la enzima inmovilizada [31].



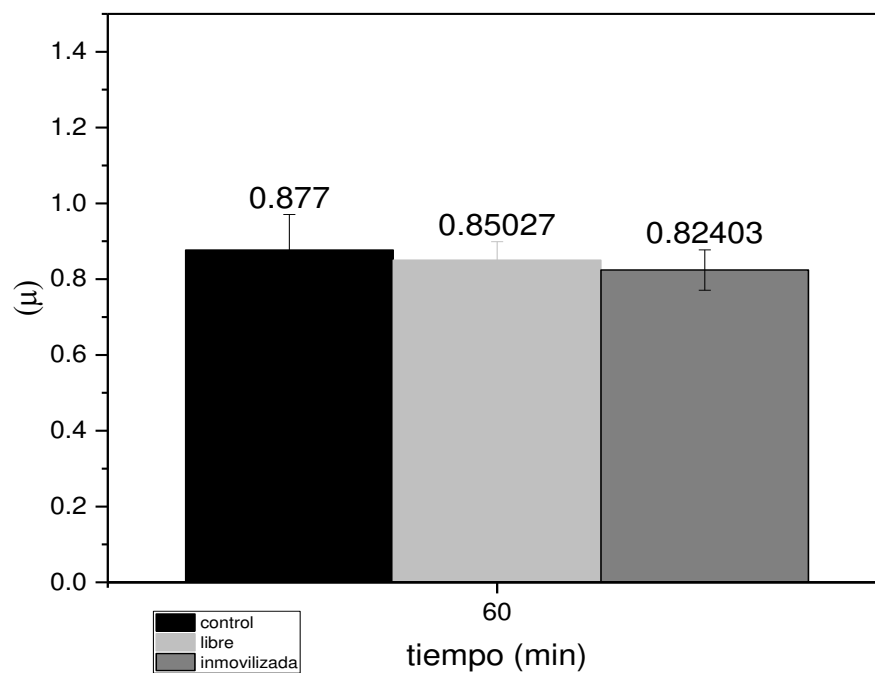
**FIG. 28** Reusabilidad de pectinasa inmovilizada en  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  en jugo de naranja

#### 4.15.3 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO PARA REDUCIR LA VISCOSIDAD DE JUGOS DE NARANJA Y MANZANA

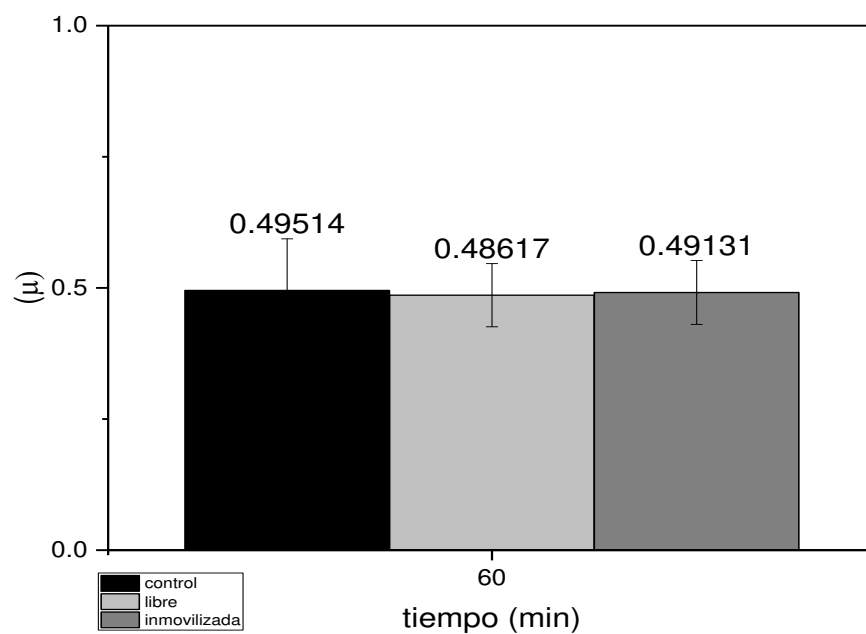
La reducción de la viscosidad está relacionada directamente con la degradación de sustancias pécticas en el tratamiento de clarificación de jugos. Se determinó la viscosidad relativa ( $\mu$ ) presente en las bebidas analizadas antes y después del tratamiento enzimático, observando una reducción en la viscosidad en jugo de naranja (FIG. 29 A) entre el uso de métodos mecánicos (control) y el tratamiento enzimático (3 y 6.04% para enzima libre e inmovilizada, respectivamente); aunque los resultados fueron favorables logrando reducir la viscosidad presente en el jugo los valores no son estadísticamente similares a lo determinado para la aplicación en jugos comerciales (21%) [77]. De igual forma, no se observó diferencia significativa entre la reducción de la viscosidad mediante métodos mecánicos y tratamiento

enzimático en jugo de manzana (FIG. 29 B), la capacidad de reducción de viscosidad es generalmente dada a partir de la aplicación de enzimas endopoligalacturonasas, sin embargo, de acuerdo a los resultados ya mencionados anteriormente, el tipo predominante de enzima generada a partir del hongo analizado en este proyecto son exo - poligacaturonasas, lo que concuerda reportado para los géneros *Penicillium* sp. [30]. El tratamiento de clarificación en jugos se realizó por debajo de las condiciones óptimas de la actividad inmovilizada determinada anteriormente, lo que podría explicar la diferencia entre los datos obtenidos experimentalmente y los reportados por la literatura, ya que en evaluaciones previas de la estabilidad operacional de pectinasas inmovilizadas en nanopartículas magnéticas en jugo de manzana a temperaturas altas (40 y 50° C) reduciendo la viscosidad 22 y 18% con enzima libre e inmovilizada, respectivamente [75].

A)



B)



**FIG. 29** Viscosidad determinada utilizando enzima libre e inmovilizada en jugo de A) naranja y B) manzana

## 5. CONCLUSIONES

En el desarrollo de este trabajo se logró cumplir con los objetivos planteados, iniciando con la identificación del hongo aislado observando las características morfológicas propias del género *Penicillium sp.* El hongo aislado presentó actividad pectinolítica en placa.

Se logró la optimización de la producción enzimática alcanzando una actividad de 340.9 U/mL, utilizando cáscara de limón como cosustrato en fermentación sumergida, bajo condiciones óptimas a temperatura de 35°C y pH 6.0.

La optimización de las condiciones para la medición de actividad enzimática se obtuvo a 35°C y pH 5.0, alcanzando 888.16 U/mL.

Se determinaron los parámetros cinéticos mediante el modelo de Michaelis-Menten, presentando una  $V_{\text{máx}}$  de  $2.578 \pm 0.024 \mu\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $k_m$  de  $0.115 \pm 0.010 \mu\text{mol} / \text{mL}$  indicando una buena afinidad de la enzima-sustrato.

Se realizó la purificación de las pectinasas por varios métodos, sin embargo, se eligió la fracción obtenida por ultrafiltración (<50 kDa) para la inmovilización, la cual incrementó la actividad enzimática total un 9.08% con un rendimiento del 62.15%.

Se logró sintetizar el material *core-shell* de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ , el cual mantuvo la estructura cristalina de la magnetita según lo reportado por DRX, FTIR-ATR, SEM-EDS y XPS.

La funcionalización con grupos amino y con el glutaraldehído del *core-shell* se logró satisfactoriamente según los resultados de potencial  $\zeta$  y XPS.

Se determinó la cantidad óptima glutaraldehído en 25% v/v para llevar a cabo la inmovilización enzimática, así como la concentración de saturación de enzima por gramo de material, determinando la capacidad máxima de quimisorción por la isoterma de adsorción de la enzima en el material.

La inmovilización de pectinasas se realizó a una concentración inicial de 1.0 % v/v en nanopartículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  reteniendo el 80% de la actividad inicial.

Las condiciones óptimas de operación de las pectinasas inmovilizadas fueron a pH 4.5 y temperatura de 50° C.

Se evaluó la capacidad de reducción de turbidez en jugo de naranja con enzimas libre e inmovilizadas alcanzando 30% y sin mostrar diferencia significativa entre ellas.

La actividad relativa de la enzima inmovilizada después de 5 ciclos de reuso fue de 84% en jugo de naranja, indicando una aplicación eficaz en el tratamiento de clarificación en jugos.

La hipótesis se rechaza, ya que no se alcanzó la reducción del 90% de la viscosidad, sin embargo se alcanza una reducción del 60% de la turbidez. Esto se debe a que el que el hongo filamentoso aislado es del género *Penicillium*, los cuales son buenos productores de exo-pectinasas, que son las que afectan la turbidez, pero producen muy poco de las endo-pectinasas que son las responsables de disminuir la viscosidad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. R. Tapre and R. K. Jain, "Pectinases: Enzymes for fruit processing industry," *Int. Food Res. J.*, vol. 21, no. 2, pp. 447–453, 2014.
- [2] D. B. Pedrolli, A. C. Monteiro, E. Gomes, and E. C. Carmona, "Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes," *Open Biotechnol. J.*, vol. 3, no. 1, pp. 9–18, 2009, doi: 10.2174/1874070700903010009.
- [3] I. Ahmed, M. A. Zia, M. A. Hussain, Z. Akram, M. T. Naveed, and A. Nowrouzi, "Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization," *J. Radiat. Res. Appl. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 148–154, 2016, doi: 10.1016/j.jrras.2015.11.003.
- [4] V.-G. G. y L. O. García-Ignacio H.1, Tlecuil-Beristain S. 1, Juárez-Hernández J. 1, "IDENTIFICACION DE PATRONES DE REPRESION POR CARBONO DE *Aspergillus niger* EN CEPAS HAPLOIDES Y EN SU DIPLOIDE SOBREPRODUCTOR DE PECTINASAS 1," vol. 133, p. 90180, 2007.
- [5] S. Kumar, H. K. Sharma, and B. C. Sarkar, "Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF)," *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1289–1298, 2011, doi: 10.1007/s10068-011-0178-3.
- [6] K. Rajdeo, T. Harini, K. Lavanya, and N. W. Fadnavis, "Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice," *Food Bioprod. Process.*, vol. 99, pp. 12–19, 2016, doi: 10.1016/j.fbp.2016.03.004.
- [7] E. A. Karam, W. A. Abdel Wahab, S. A. A. Saleh, M. E. Hassan, A. L. Kansoh, and M. A. Esawy, "Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 102, pp. 694–703, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.033.
- [8] R. L. de Oliveira, J. L. Dias, O. S. da Silva, and T. S. Porto, "Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor," *Food Bioprod. Process.*, vol. 109, pp. 9–18, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.005.
- [9] Z. Deng, F. Wang, B. Zhou, J. Li, B. Li, and H. Liang, "Food Hydrocolloids Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application," *Food Hydrocoll.*, vol. 89, no. June 2018, pp. 691–699, 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.11.031.
- [10] L. Dal Magro, J. F. Kornecki, M. P. Klein, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-Lafuente, "Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 132, no. August 2019, p. 109397, 2020, doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109397.
- [11] C. M. Lanza, "Processed and Derived Products of Oranges," *Citrus fruits*, pp. 1346–1354, 2003.
- [12] R. M. Calderón and C. Patiño, "DISEÑO DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE JUGO CONCENTRADO DE UVA DE MESA Robert," *Repos. Inst. PIRHUA*, 2013.



- [13] C. Conidi, R. Castro-Muñoz, and A. Cassano, "Membrane-based operations in the fruit juice processing industry: A review," *Beverages*, vol. 6, no. 1, pp. 1–39, 2020, doi: 10.3390/beverages6010018.
- [14] Y. He, Z. Ji, and S. Li, "Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 57, no. 2, pp. 366–373, 2007, doi: 10.1016/j.seppur.2007.04.025.
- [15] M. Cerreti, K. Liburdi, I. Benucci, S. Emiliani Spinelli, C. Lombardelli, and M. Esti, "Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 82, pp. 58–65, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.022.
- [16] A. L. I. Nawaz and E. T. Al, "STRAIN IMPROVEMENT AND ASSESSMENT OF CULTURAL CONDITIONS FOR IMPROVED BIOSYNTHESIS OF PECTINASE USING *PENICILLIUM NOTATUM*," vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [17] N. Muñoz, "Pectinas Caracterización Y Obtención/Tr Químicos Y Físicos," pp. 2–11, 2015.
- [18] L. Flutto, "PECTIN Properties and Determination," no. 1998, pp. 1–22, 2000.
- [19] H. A. Ruiz, R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez, J. C. Contreras-Esquivel, and C. N. Aguilar, "Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor," *Biochem. Eng. J.*, vol. 65, pp. 90–95, 2012, doi: 10.1016/j.bej.2012.03.007.
- [20] R. P. De Vries *et al.*, "Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*," vol. 530, 2002.
- [21] H. A. El Enshasy, E. A. Elsayed, N. Suhaimi, R. A. Malek, and M. Esawy, "Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system," *BMC Biotechnol.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1186/s12896-018-0481-7.
- [22] M. Viviana, "Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas," 2000.
- [23] L. Palou, *Penicillium digitatum, Penicillium italicum (Green Mold, Blue Mold)*. Elsevier, 2014.
- [24] P. J. Li *et al.*, "Optimizing Production of Pectinase from Orange Peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 Using Response Surface Methodology," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 6, no. 1, pp. 13–22, 2014, doi: 10.1007/s12649-014-9317-4.
- [25] B. Wang, F. Cheng, Y. Lu, W. Ge, M. Zhang, and B. Yue, "Immobilization of pectinase from *Penicillium oxalicum* F67 onto magnetic cornstarch microspheres: Characterization and application in juice production," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 97, no. 2260, pp. 137–143, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2013.07.018.
- [26] D. Silva, E. Da Silva Martins, R. Da Silva, and E. Gomes, "Pectinase production by *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 318–324, 2002, doi: 10.1590/S1517-83822002000400008.
- [27] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, and M. Sun, "Application of iron

magnetic nanoparticles in protein immobilization,” *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 11465–11486, 2014, doi: 10.3390/molecules190811465.

- [28] X. Guo, F. Mao, W. Wang, Y. Yang, and Z. Bai, “Sulfhydryl-Modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Core/Shell Nanocomposite: Synthesis and Toxicity Assessment in Vitro,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 27, pp. 14983–14991, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b03873.
- [29] C. Reginatto *et al.*, “Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth,” *Process Biochem.*, vol. 58, no. October 2016, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.018.
- [30] A. R. Banu, M. K. Devi, G. R. Gnanaprabhal, B. V Pradeep, M. Palaniswamy, and T. Nadu, “*Penicillium chrysogenum*,” vol. 3, no. 4, pp. 377–381, 2010.
- [31] U. V. Sojitra, S. S. Nadar, and V. K. Rathod, “Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 677–685, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.10.018.
- [32] B. Wang, F. Cheng, Y. Lu, W. Ge, M. Zhang, and B. Yue, “Immobilization of pectinase from *Penicillium oxalicum* F67 onto magnetic cornstarch microspheres: Characterization and application in juice production,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 97, no. 2260, pp. 137–143, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2013.07.018.
- [33] M. Mahmoodi, G. D. Najafpour, and M. Mohammadi, “Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 12, pp. 4123–4128, 2017, doi: 10.1007/s13197-017-2829-8.
- [34] G. Bonito, O. S. Isikhuemhen, and R. Vilgalys, “Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 3, pp. 1021–1027, 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.109.
- [35] S. S. Dhillon, R. K. Gill, S. S. Gill, and M. Singh, “Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*,” *Int. J. Environ. Stud.*, vol. 61, no. 2, pp. 199–210, 2004, doi: 10.1080/0020723032000143346.
- [36] V. E. Wolf-Márquez *et al.*, “Scaling-up and ionic liquid-based extraction of pectinases from *Aspergillus flavipes* cultures,” *Bioresour. Technol.*, vol. 225, pp. 326–335, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.067.
- [37] G. Díaz-Godínez, J. Soriano-Santos, C. Augur, and G. Viniegra-González, “Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 5, pp. 271–275, 2001, doi: 10.1038/sj.jim.7000113.
- [38] I. G. Sandri, C. M. T. Lorenzoni, R. C. Fontana, and M. M. da Silveira, “Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 469–475, 2013, doi: 10.1016/j.lwt.2012.10.015.
- [39] M. M. Bradford, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,” vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [40] G. L. Miller, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing

Sugar,” *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.

- [41] P. Yuan *et al.*, “A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification,” *Food Chem.*, vol. 129, no. 4, pp. 1369–1375, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.065.
- [42] O. Habrylo, D. E. Evangelista, P. V. Castilho, J. Pelloux, and F. Henrique-Silva, “The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 112, pp. 499–508, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.172.
- [43] D. R. Kashyap, S. Chandra, A. Kaul, and R. Tewari, “Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 16, no. 3, pp. 277–282, 2000, doi: 10.1023/A:1008902107929.
- [44] J. Pagnonceli *et al.*, “Biotechnological potential of an exo-polygalacturonase of the new strain *Penicillium janthinellum* VI2R3M: biochemical characterization and clarification of fruit juices,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 127, no. 6, pp. 1706–1715, 2019, doi: 10.1111/jam.14426.
- [45] G. Fang, H. Chen, Y. Zhang, and A. Chen, “Immobilization of pectinase onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> and its activity and stability,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 88, pp. 189–195, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.059.
- [46] J. Xu, J. Sun, Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, and M. Sun, “Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization,” *Molecules*, vol. 19, no. 8, pp. 11465–11486, 2014, doi: 10.3390/molecules190811465.
- [47] Y. Zhu, S. Kaskel, J. Shi, T. Wage, and K. H. Van Pée, “Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres,” *Chem. Mater.*, vol. 19, no. 26, pp. 6408–6413, 2007, doi: 10.1021/cm071265g.
- [48] J. Wang, S. Zheng, Y. Shao, J. Liu, Z. Xu, and D. Zhu, “Amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 349, no. 1, pp. 293–299, 2010, doi: 10.1016/j.jcis.2010.05.010.
- [49] M. Seenuvasan *et al.*, “Fabrication, characterization and application of pectin degrading Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> nanobiocatalyst,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 4, pp. 2273–2279, 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.01.050.
- [50] Z. Lei, S. Bi, B. Hu, and H. Yang, “Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 3, pp. 889–896, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.045.
- [51] S. Muthulingam *et al.*, “Immobilization of pectinase on co-precipitated magnetic nanoparticles for enhanced stability and activity,” *Res. J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 5, pp. 24–30, 2013.
- [52] J. Oliveira, J. Fernando, E. Fernandes, D. Araújo, M. Vieira, and D. Queiroz, “Short communication Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 602–606, 2017, doi: 10.1016/j.bjm.2016.12.009.

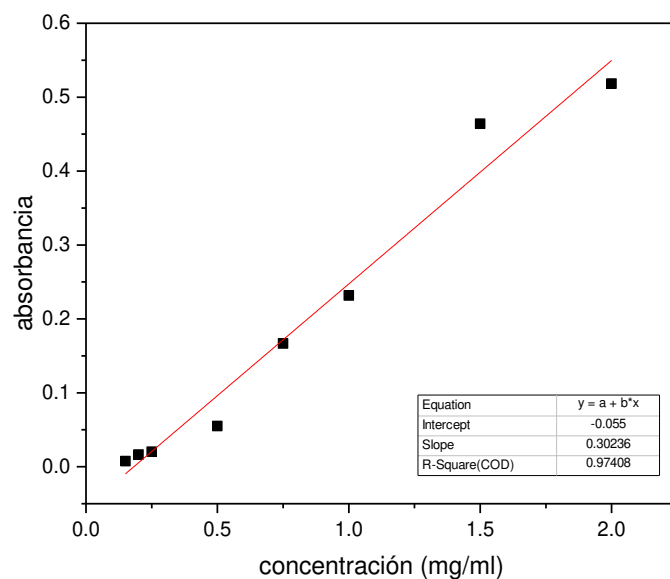
- [53] S. Satapathy, P. M. Behera, D. K. Tanty, and S. Srivastava, "Isolation and molecular identification of pectinase producing *Aspergillus* species from different soil samples of Bhubaneswar regions," 2019.
- [54] L. Mendoza Vargas, J. Jiménez Forero, and M. Ramírez Niño, "Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.)," *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Científica*, vol. 20, no. 1, pp. 131–138, 2017, doi: 10.31910/rudca.v20.n1.2017.70.
- [55] N. Hadj-Taieb, M. Ayadi, S. Trigui, F. Bouabdallah, and A. Gargouri, "Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 5, pp. 662–666, 2002, doi: 10.1016/S0141-0229(02)00029-7.
- [56] C. Y. Kawano, M. A. Dos Santos Cunha Chellegatti, S. Said, and M. J. V. Fonseca, "Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 29, no. 2, pp. 133–140, 1999, doi: 10.1111/j.1470-8744.1999.tb00542.x.
- [57] L. de M. B. Silva, T. C. Gomes, S. F. Ullah, A. R. P. Ticona, P. R. V. Hamann, and E. F. Noronha, "Biochemical Properties of Carbohydrate-Active Enzymes Synthesized by *Penicillium chrysogenum* Using Corn Straw as Carbon Source," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 11, no. 6, pp. 2455–2466, 2020, doi: 10.1007/s12649-019-00589-x.
- [58] N. N. A. K. Shah, R. A. Rahman, R. Shamsuddin, and N. M. Adzahan, "Effects of pectinase clarification treatment on phenolic compounds of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) fruit juice," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 8, pp. 5057–5065, 2015, doi: 10.1007/s13197-014-1554-9.
- [59] E. Lugo and L. Del Toro, "EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE LIMA ( *Citrus limetta* Risso ) EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM LIME PEEL ( *Citrus limetta* Risso )," no. December, 2013, doi: 10.18633/bt.v15i3.153.
- [60] J. J. Villeda Moreno, "“ Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria ,”" *Univ. Autónoma Agrar. Antonio Narro*, p. 67, 2010.
- [61] N. P. Patil and B. L. Chaudhari, "Production and Purification of Pectinase By Soil Isolate *Penicillium* Sp and Search for Better Agro-Residue for Its Ssf," *Recent Res. Sci. Technol.*, vol. 2, no. 7, pp. 36–42, 2010, [Online]. Available: <http://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/486>.
- [62] D. de Andrades, N. G. Graebin, M. K. Kadowaki, M. A. Z. Ayub, R. Fernandez-Lafuente, and R. C. Rodrigues, "Immobilization and stabilization of different  $\beta$ -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protoconternational Journal of Biological Macromoleculesl depends on the enzyme," *I*, vol. 129, pp. 672–678, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057.
- [63] F. Amin, H. Nawaz, M. Bilal, and M. Asgher, "International Journal of Biological Macromolecules Improvement of activity , thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo -polygalacturonase," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 974–984, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.086.
- [64] M. A. D. S. C. Chellegatti, M. J. V. Fonseca, and S. Said, "Purification and partial

- characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*,” *Microbiol. Res.*, vol. 157, no. 1, pp. 19–24, 2002, doi: 10.1078/0944-5013-00127.
- [65] F. Amin, H. N. Bhatti, M. Bilal, and M. Asgher, “Purification, Kinetic, and Thermodynamic Characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with Industrial Perspective,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 183, no. 1, pp. 426–443, 2017, doi: 10.1007/s12010-017-2455-y.
- [66] K. F. Oliveira, L. Malavolta, C. S. Souza, E. J. Vicente, and C. Laluece, “Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 100, no. 4, pp. 633–640, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02823.x.
- [67] E. R. D. Luis Beltrán Ramos-Sánchez, Gualberto Leon-Revelo, Mario César Cujilema-Quitio, Linnet Baryolo, “Modelo cinético para la producción de celulasas por una cepa de *aspergillus niger* en fermentación sólida,” *SciELO*, vol. 45, p. 7, 2018, [Online]. Available: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612018000200001&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612018000200001&script=sci_arttext&tlng=en).
- [68] Q. Chang and H. Tang, “Immobilization of horseradish peroxidase on NH<sub>2</sub>-modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol,” *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 15768–15782, 2014, doi: 10.3390/molecules191015768.
- [69] M. Jafarzadeh, E. Soleimani, P. Norouzi, R. Adnan, and H. Sepahvand, “Preparation of trifluoroacetic acid-immobilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTES nanocatalyst for synthesis of quinolines,” *J. Fluor. Chem.*, vol. 178, pp. 219–224, 2015, doi: 10.1016/j.jfluchem.2015.08.007.
- [70] F. Liu, F. Niu, N. Peng, Y. Su, and Y. Yang, “Synthesis, characterization, and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> nanoparticles,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 23, pp. 18128–18136, 2015, doi: 10.1039/c4ra15968c.
- [71] M. Vanegas, V. Vázquez, D. Moscoso, and C. Cruzat, “Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas del tipo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, efecto del pH en la dispersión y estabilización en soluciones acuosas,” *Maskana*, vol. 5, no. 1, pp. 43–55, 2014, doi: 10.18537/mskn.05.01.04.
- [72] L. Sun *et al.*, “Malachite green adsorption onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>: Isotherms, kinetic and process optimization,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 16, pp. 11837–11844, 2015, doi: 10.1039/c4ra13402h.
- [73] S. Kamari and A. Shahbazi, “Biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> nanocomposite as a green nanofiller embedded in PES–nanofiltration membrane matrix for salts, heavy metal ion and dye removal: Long-term operation and reusability tests,” *Chemosphere*, vol. 243, p. 125282, 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125282.
- [74] F. Y. Zhao, Y. L. Li, and L. H. Li, “Preparation and characterization of magnetite nanoparticles,” *Appl. Mech. Mater.*, vol. 618, pp. 24–27, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.618.24.
- [75] L. Mosafa, M. Shahedi, and M. Moghadam, “Magnetite nanoparticles immobilized pectinase: Preparation, characterization and application for the fruit juices clarification,” *J. Chinese Chem. Soc.*, vol. 61, no. 3, pp. 329–336, 2014, doi:

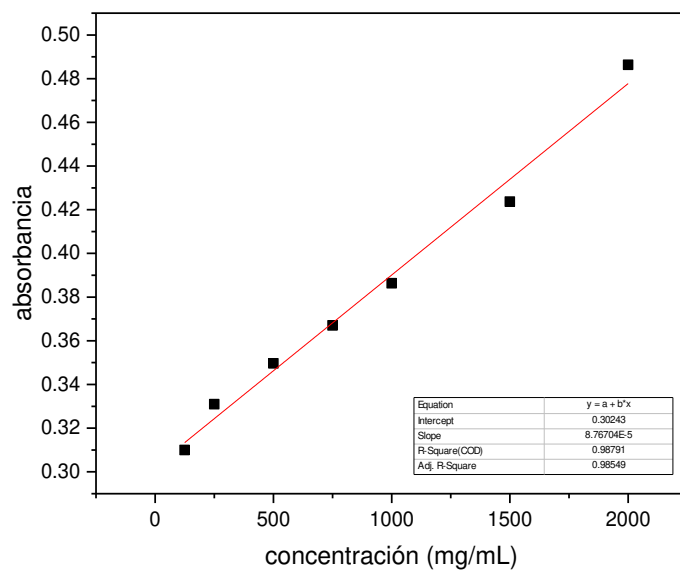
10.1002/jccs.201300347.

- [76] M. Cerreti, K. Markošová, M. Esti, M. Rosenberg, and M. Rebroš, "Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 2, pp. 531–539, 2017, doi: 10.1111/ijfs.13309.
- [77] N. Diano *et al.*, "Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 23, pp. 11471–11477, 2008, doi: 10.1021/jf8019437.

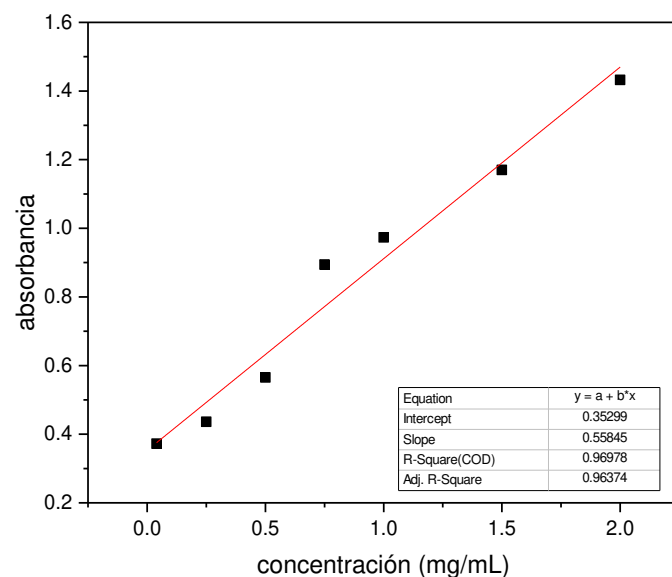
## ANEXO I



**FIG A 1.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR EL MÉTODO DE DNS USANDO COMO ESTÁNDAR ÁCIDO GALACTURÓNICO.



**FIG A 2.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR POR EL MÉTODO DE BRADFORD USANDO COMO ESTÁNDAR ALBUMINA SÉRICA



**FIG A 3.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN - CIOCALTEU USANDO COMO ESTÁNDAR ÁCIDO TÁNICO



## ANEXO II



**FIG A 4.** HALO DE HIDRÓLISIS PRODUCIDO POR UN HONGO FILAMENTOSO EN MEDIO SUPLEMENTADO CON PECTINA 2%

### ANEXO III

**TABLA 19.** RESULTADOS DEL ANOVA DE MODELO CUADRÁTICO DE LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

	SUMA DE CUADRADOS	df	MEDIA DE CUADRADOS	F	P	
Modelo	6.054E+05	5	1.211E+05	11.51	0.0029	significant
A-Temp	8410.90	1	8410.90	0.7999	0.4008	
B-pH	11841.61	1	11841.61	1.13	0.3238	
AB	3116.27	1	3116.27	0.2964	0.6031	
A <sup>2</sup>	3.153E+05	1	3.153E+05	29.98	0.0009	
B <sup>2</sup>	69490.29	1	69490.29	6.61	0.0370	
Residual	73601.65	7	10514.52			
Lack of Fit	73601.65	3	24533.88			
Pure Error	0.0000	4	0.0000			
Cor Total	6.790E+05	12				

**TABLA 20.** RESULTADOS DEL ANOVA DE MODELO CUADRÁTICO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

	SUMA DE CUADRADOS	df	MEDIA DE CUADRADOS	F	P	
Modelo	1.429E+06	5	2.859E+05	480.75	< 0.0001	significant
A-Temp	10100.02	1	10100.02	16.99	0.0045	
B-pH	8.451E+05	1	8.451E+05	1421.23	< 0.0001	
AB	1773.67	1	1773.67	2.98	0.1278	
A <sup>2</sup>	3072.18	1	3072.18	5.17	0.0572	
B <sup>2</sup>	4.577E+05	1	4.577E+05	769.63	< 0.0001	
Residual	4162.44	7	594.63			
Lack of Fit	4162.44	3	1387.48			
Pure Error	0.0000	4	0.0000			
Cor Total	1.434E+06	12				